



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

FACULTADE DE CIENCIAS DA SAÚDE

**MESTRADO EN ASISTENCIA E INVESTIGACIÓN SANITARIA  
ESPECIALIDADE: FUNDAMENTOS DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA**

Curso académico 2015-16

TRABALLO DE FIN DE MESTRADO

**Cáncer de mama e alteracións asociadas no  
proceso de cicatrización da pel: Implicación  
da conexina 43**

**Marina Rodríguez-Candela Mateos**

27 de Xuño de 2016

A Dra. María D. Mayán Santos, coordinadora do grupo CellCOM-SB no Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC), e o Dr. Benigno Acea Nebril, cirurxián da Unidade de Mama do Complexo Hospitalario Universitario de A Coruña (CHUAC-XXIAC) e investigador do grupo CellCOM-SB (INIBIC),

CERTIFICAN QUE

A presente memoria de Traballo de Fin de Mestrado titulada **“Cáncer de mama e alteracións asociadas no proceso de cicatrización da pel: Implicación da conexina 43”** presentada por Dona Marina Rodríguez-Candela Mateos, foi realizada baixo a súa dirección no INIBIC, foi revisada e atópase en disposición de ser presentada.

Para que así conste, asinan o presente certificado en A Coruña, a 17 de xuño de 2016.




Asdo. Dra. María D. Mayán Santos

*Directora do Traballo de Fin de Mestrado*



Asdo. Dr. Benigno Acea Nebril

*Co-director do Traballo de Fin de Mestrado*



Asdo. Marina Rodríguez-Candela Mateos

## ÍNDICE

<b>1._ ABREVIATURAS .....</b>	<b>1</b>
<b>2._ RESUMO .....</b>	<b>2</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>3</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>4</b>
<b>3._ INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>5</b>
3.1._ Anatomía da glándula mamaria.....	5
3.2._ O cancro de mama .....	6
3.3._ Comunicación celular mediante canles de conexinas. Expresión e funcións das conexinas no tecido mamario .....	9
3.4._ Tratamento do cancro de mama e alteracións na cicatrización cutánea. Función das conexinas en pel.....	13
<b>4._ MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>16</b>
4.1._ Ensaio inmunohistoquímico de tecido mamario, cutáneo e ganglionar de pacientes dos diversos subtipos de cancro de mama sometidas a diversos tratamentos .....	16
4.2._ Fibroblastos dérmicos procedentes de pacientes sometidas a radioterapia e quimioterapia .....	18
4.2.1._ Obtención de mostras cutáneas e cultivo primario de fibroblastos dérmicos .....	18
4.2.2._ Estudo do fenotipo fibroblástico .....	19
4.2.3._ Electroforese desnaturante en xel de poliacrilamida (SDS- PAGE) e Western Blot.....	19
4.2.3.1._ Preparación das mostras.....	19
4.2.3.2._ Electroforese desnaturante .....	20
4.2.3.3._ Transferencia.....	20
4.2.4._ Estudo da funcionalidade das <i>gap junctions</i> de Cx43: ensaios de transferencia de marcadores fluorescentes.....	21
<i>Scrape-loading</i> .....	21
Microinxección de marcadores fluorescentes.....	22

<b>5._ RESULTADOS</b> .....	23
5.1._ Niveis proteicos e localización celular da Cx43 en mama de pacientes con diferentes subtipos de cancro de mama suxeitas a diversos tratamentos e comparación con tecidos control .....	23
5.2._ Expresión da Cx43 en pel e fibroblastos dérmicos de pacientes sometidas a quimioterapia e radioterapia e comparación con pel non tratada .....	30
5.3._ Funcionalidade das <i>gap junctions</i> e acoplamento celular en fibroblastos dérmicos de pacientes suxeitas a quimioterapia e radioterapia e comparación con fibroblastos de pel non tratada .....	32
5.4._ Análise fenotípica de fibroblastos dérmicos procedentes de pel radiada e sa.....	34
<b>6._ DISCUSIÓN</b> .....	35
<b>7._ CONCLUSIÓNS</b> .....	39
<b>8._ AGRADECEMENTOS</b> .....	40
<b>9._ BIBLIOGRAFÍA</b> .....	40
<b>ANEXOS</b> .....	49
<b>ANEXO 1: MODELO DOCUMENTO DE INFORMACIÓN PARA PARTICIPANTES NO PROXECTO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA .</b>	49
<b>ANEXO 2: MODELO CONSENTIMIENTO INFORMADO DO PARTICIPANTE MAIOR DE IDADE, TESTEMUÑA E REPRESENTANTE LEGAL</b> .....	57

## 1.\_ ABREVIATURAS

CAEIG - Comité Autonómico de Ética de Investigación de Galicia

CHUAC-XXIAC - Complexo Hospitalario Universitario de A Coruña-

Xerencia Xestión Integrada A Coruña

Cx43 - conexina43

Cxs - conexinas

DAB - diaminobenzidina

DCIS - carcinoma ductal *in situ*

DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

EDTA - ácido etilendiaminotetraacético

ETD - ducto terminal extralobulillar

FBS - soro bovino fetal

HER 2 - receptor 2 do oncoxén do factor de crecemento epidérmico humano

ITD - ducto terminal intralobulillar

LCIS - carcinoma lobular *in situ*

LY - *Lucifer Yellow*

PBS - tampón fosfato salino

PBST - tampón fosfato salino con Tween 20

PMSF - fluoruro de fenilmetilsulfonilo

RE - receptor de estrógenos

RPg - receptor de proxesterona

SDS - dodecilsulfato sódico

SDS-PAGE - electroforese en xel de poliacrilamida con dodecilsulfato

TDLU - unidade ducto-lobulillar terminal

TTBS - tampón de lavado con Tween20

## 2.\_ RESUMO

As conexinas son proteínas implicadas na comunicación célula-célula (unións comunicantes) e célula-matriz (hemicanles). Mutacións ou alteracións na actividade da conexina43 (Cx43) están relacionadas cun importante número de enfermidades, entre elas o cancro de mama, onde tradicionalmente describiuse que actúa como factor supresor de tumores, mais o seu papel durante o inicio, desenvolvemento e proceso de metástase aínda se atopa suxeito a gran debate. No presente proxecto estudáronse os niveis e a sublocalización celular desta proteína en mostras de diferentes subtipos de cancro de mama. Os resultados obtidos suxiren unha perda da expresión da Cx43 nas zonas tumorais invasivas, presentando niveis moderados no caso dos carcinomas *in situ*. En canto ao subtipo luminal B con lesións infiltrantes, a Cx43 atópase sobreexpresada nas zonas tumorais tanto a nivel citoplasmático como na membrana. Así mesmo ubicouse esta proteína en dúas ocasións nas células ductais, situación pouco descrita na literatura.

Unha segunda liña de traballo centrouse na participación da Cx43 nun problema clínico de gran prevalencia e pouco estudado que afecta a estas pacientes suxeitas a quimioterapia e/ou radioterapia, nas que a estrutura da pel e proceso de cicatrización cutánea atópanse considerablemente alterados. A partir dos resultados adquiridos pódese afirmar que fibroblastos illados de pel de pacientes sometidas a radioterapia presentan cambios no fenotipo, sobreexpresan Cx43 e manifestan niveis moi baixos de acoplamento celular mediante unións comunicantes funcionais. No caso da quimioterapia, a comunicación celular tamén aparece comprometida.

## RESUMEN

Las conexinas son proteínas implicadas en la comunicación célula-célula (uniones comunicantes) y célula-matriz (hemicanales). Mutaciones o alteraciones en la actividad de la conexina43 (Cx43) están relacionadas con un importante número de enfermedades, entre ellas el cáncer de mama, donde tradicionalmente se ha descrito que actúa como factor supresor de tumores, aunque su papel durante el inicio, desarrollo y proceso de metástasis aún se encuentra sujeto a gran debate. En el presente proyecto se han estudiado los niveles y la sublocalización celular de esta proteína en muestras de diferentes subtipos de cáncer de mama. Los resultados obtenidos sugieren una pérdida de la expresión de la Cx43 en las zonas tumorales invasivas, presentando niveles moderados en el caso de los carcinomas *in situ*. En cuanto al subtipo luminal B con lesiones infiltrantes, la Cx43 se halla sobreexpresada en las zonas tumorales tanto a nivel citoplasmático como en la membrana. Asimismo se ubicó esta proteína en dos ocasiones en las células ductales, situación poco descrita en la literatura.

Una segunda línea de trabajo se ha centrado en la participación de la Cx43 en un problema clínico de gran prevalencia y poco estudiado que afecta a estas pacientes sujetas a quimioterapia y/o radioterapia, en las que la estructura de la piel y proceso de cicatrización cutánea se encuentran considerablemente alterados. A partir de los resultados adquiridos se puede afirmar que fibroblastos aislados de piel de pacientes sometidas a radioterapia presentan cambios en el fenotipo, sobreexpresan Cx43 y manifiestan niveles muy bajos de acoplamiento celular mediante uniones comunicantes funcionales. En el caso de la quimioterapia, la comunicación celular también aparece comprometida.

## ABSTRACT

Connexins are proteins involved in cell to cell (gap junctions) and cell to matrix communication (hemichannels). Mutations or alterations in the activity of connexin43 (Cx43) are related to a great number of diseases, among them breast cancer, in which it was traditionally assumed as a tumor suppressor, although its role during tumour onset, development and metastasis is still being debated. In this project we studied the levels and cellular sub-location of this protein in samples of different breast cancer subtypes. Our results show that invasive tumours lose the expression of Cx43, while moderate levels of the protein were detected in the *in situ* carcinomas. However, as for infiltrative regions in the luminal B subtype, Cx43 is overexpressed and found in the cytoplasm and membranes. In a couple of cases, Cx43 was located in the ductal cells, a seldom-described location in the literature.

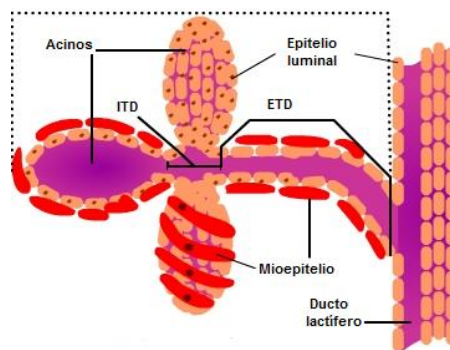
A second line of work focused on connexin 43 participation in a highly-prevalent but poorly-studied clinical problem that affects patients that undergo chemotherapy and/or radiotherapy, for which skin structure and healing are greatly impaired. According to our results, we can affirm that radiated skin fibroblasts show changes in the phenotype, overexpress connexin 43 and display low cell coupling mediated by functional gap junctions. As for chemotherapy, cell communication seems to be damaged as well.



### 3.\_ INTRODUCCIÓN

#### 3.1.\_ Anatomía da glándula mamaria

A mama é unha glándula epitelial modificada que repousa sobre a parede torácica e se atopa envolta en fascia fibrosa. Pódense diferenciar tres estruturas principais: pel, tecido subcutáneo e tecido mamario (parénquima e estroma). O parénquima está formado por 15-20 lóbulos ou segmentos que converxen radialmente na mamila, e que drenan nos seus respectivos ductos, os cales á súa vez conflúen en 6-10 ductos colectores que finalmente desembocan no exterior á altura da mamila. Os lóbulos atópanse subdivididos en 20-40 lobulillos, compostos por cadanseus alveolos ou acinos, en número de 10 a 100 (1). A unidade ducto-lobulillar terminal (TDLU - *terminal ductal lobular unit* -) é a unidade funcional mamaria, na que se orixinan a meirande parte dos cambios (procesos metaplásicos, hiperplásicos e neoplásicos), e defínese como o conxunto conformado polo ducto terminal extralobulillar (ETD - *extralobular terminal duct* -), o ducto terminal intralobulillar (ITD - *intralobular terminal duct* -) e *clusters* de 10-100 acinos que drenan no ITD (2,3) (Fig. 1). O ETD mantén unido o lobulillo ao sistema de ductos, namentres que o ITD prolonga dito sistema cara ao interior dos lobulillos. Pódense distinguir así mesmo o seo lactífero ou galactóforo, unha lixeira dilatación da rexión distal do ducto principal na súa desembocadura na mamila (1).



**Figura 1.** Estrutura da unidade ducto-lobulillar terminal mamaria, onde se aprecia o ITD, o ETD e os *clusters* de acinos, así como a presenza dos dous tipos celulares (mioepiteliais e luminais) do sistema ducto-lobulillar. Imaxe tomada e modificada de <http://www.rnceus.com/dcis/anat.html#Link866673Context>

O tecido glandular e os ductos atópanse suxeitos polos ligamentos de Cooper (tecido conectivo) e están arrodeados por tecido adiposo. A distribución dos lóbulos non é uniforme, habendo un predominio dos mesmos no cuadrante superior externo do peito (1,4).

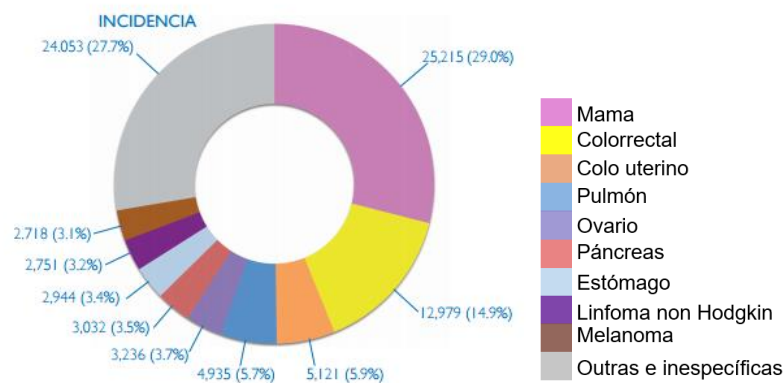
O estroma está integrado por tecido conectivo especializado que envolve aos ductos e lóbulos parenquimais, estroma fibroso interlobular denso e tecido adiposo, así como ligamentos, vasos sanguíneos e linfáticos, nódulos linfáticos e nervios (1,5).

No que concirne aos tipos celulares no tecido mamario normal, cabe salientarmos dous diferentes presentes nos dúctulos dos lobulillos: células luminais ou ductais e células mioepiteliais. As células luminais repousan sobre unha membrana basal eosinofílica (da que acostuman estar separadas por unha vacuolización infranuclear) e arrodean un espazo luminal que pode encerrar material secretor. As células mioepiteliais teñen un núcleo máis triangular e chan cás basais, e se atopan directamente unidas á dita membrana (6). Estas células presentan ademais un gran potencial como supresores tumorais naturais, xa que inhiben a proliferación das células neoplásicas mamarias ao promover a apoptose e inhibir a anxioxénese (7). Desempeñan tamén un papel importante na excreción do leite durante a lactación grazas ás súas propiedades contráctiles, no desenvolvemento e diferenciación das células luminais (8), así como no mantemento da polaridade da bicapa epitelial mamaria (9).

### **3.2.\_ O cancro de mama**

O cancro de mama é unha patoloxía que se caracteriza pola proliferación acelerada e descontrolada das células do epitelio glandular mamario, podendo chegar a diseminarse por vía sanguínea ou linfática, metastatizando a órganos distantes (xeralmente ósos, pulmóns, fígado e cerebro).

De acordo cos datos máis recentes a nivel global, o cancro de mama é o que amosa valores superiores de incidencia, mortalidade e prevalencia a 5 anos en mulleres (29 %, 15.5 % e 40.8 %, respectivamente) (10,11) (Fig. 2). Segundo o informe emitido o presente ano 2016 pola Sociedade Española de Oncoloxía Médica e que recolle os últimos datos de incidencia, mortalidade, supervivencia e prevalencia do cancro en España, o cancro de mama foi o tumor máis frecuentemente diagnosticado en mulleres en 2012 (25215 casos novos), e a principal causa de morte en mulleres no mesmo ano (6075 casos) (12).



**Figura 2.** Gráficos amosando a incidencia, mortalidade e prevalencia aos 5 anos dos tipos de tumor máis frecuentes na muller, consonte os datos obtidos por Ferlay *et al.*, 2015 (10) e Bray *et al.*, 2013 (11). Imaxes tomadas e modificadas de [http://www.seom.org/seomcms/images/stories/recursos/Las\\_cifras\\_del\\_cancer\\_2014.pdf](http://www.seom.org/seomcms/images/stories/recursos/Las_cifras_del_cancer_2014.pdf).

Pódense distinguir neoplasias mamarias *in situ* ou invasivas (infiltrantes). Os carcinomas *in situ* poden ser lobulares ou ductais, ou unha mestura de ambos. O carcinoma ductal *in situ* (DCIS - *ductal carcinoma in situ* -) caracterízase pola substitución das células epiteliais normais dos ductos mamarios por células tumorais, levando a unha expansión dos ductos e lobulillos pero sen diseminarse máis aló da capa celular na que se orixinou (non invasivo). O DCIS é o tipo de tumor mamario *in situ* máis común (83% dos casos diagnosticados no período 2008-2012), e pode progresar ou non a formas neoplásicas infiltrantes. O carcinoma lobular *in situ* (LCIS - *lobular carcinoma in situ* -) afecta ás células dos lobulillos mamarios, e crese que non é un precursor de cancros invasivos, senón máis ben un indicador de risco incrementado de desenvolvemento de

tumores infiltrantes. A frecuencia do LCIS é moi inferior á do DCIS, supoñendo tan só un 13% dos carcinomas mamarios *in situ* diagnosticados en mulleres no período 2008-2012 (13).

Os tumores invasivos ou infiltrantes representan a maioría de casos de cancro de mama. Neles, as células afectadas atravesan as paredes das glándulas e/ou ductos onde se orixinan e medran no tecido da contorna. A prognose desta patoloxía invasiva depende en gran medida do estadio da enfermidade. De acordo co sistema SEER (*Surveillance, Epidemiology, and End Results Summary Stage System*) distínguense tres fases. A fase local correspóndese con tumores confinados ao peito, mentres que o estadio rexional refírese a cancros xa propagados ao tecido circundante e nódulos linfáticos próximos. A derradeira etapa, distante, concirne a neoplasias que metastatizaran a órganos distantes ou nódulos linfáticos por encima da clavícula (13). O cancro de mama comprende 21 subtipos histolóxicos e polo menos cinco subtipos moleculares, caracterizados por unha variabilidade na presentación, resposta ao tratamento, pronóstico e factores de risco (14, 15).

Pódense distinguir cinco subtipos de cancro de mama (Táboa I) tendo en conta criterios tales como a definición inmunohistoquímica do receptor de estróxenos (RE) e proxesterona (RPg), a detección da sobreexpresión e/ou amplificación do receptor 2 do oncoxén do factor de crecemento epidérmico humano (HER 2) e o índice Ki-67 (factor de proliferación celular) (16). O subtipo luminal A representa aproximadamente un 74% dos tumores mamarios; presenta un desenvolvemento lento, prognose máis favorable (asociada á expresión dos receptores hormonais e potencial resposta favorable á terapia hormonal) e menor agresividade cóos demais subtipos (17). Pola contra, o subtipo luminal B supón un 10% dos casos e é máis agresivo có anterior (18). O subtipo triplo negativo (12% tumores mamarios) é máis común en mulleres premenopáusicas, e no caso de presentarse coa mutación no xen BRCA1 amosa un peor pronóstico. Dito subtipo carece actualmente de terapias dirixidas (19, 20). Finalmente, o 4% dos casos de cancro de mama pertencen ao

subtipo HER2 +, cunha capacidade de propagación máis agresiva e peor prognose cós subtipos que expresan o receptor de estróxenos (19), aínda con resultados cada vez máis favorables grazas ao emprego de terapias dirixidas (13).

**Táboa I.** Subtipos de cancro de mama e principais características clínico-patolóxicas. Tomado e modificado de Goldhirsch *et al.*, 2011 (16).

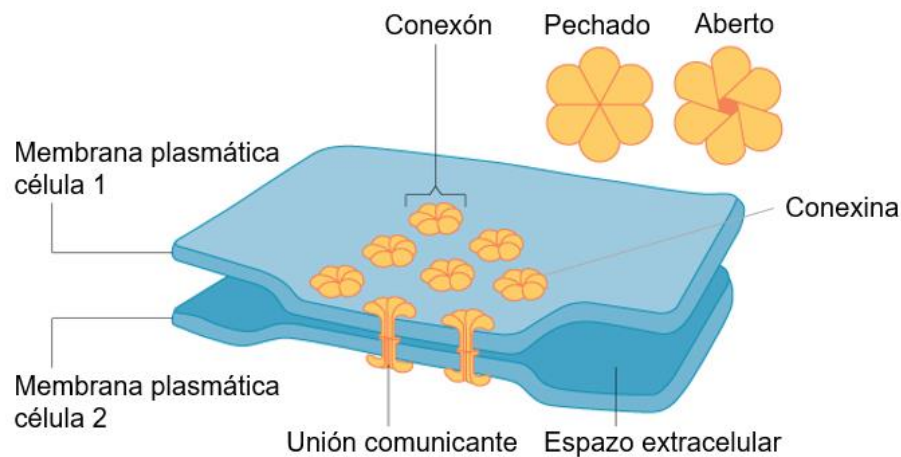
Subtipo de cancro de mama	Definición clínico-patolóxica
<b>Luminal A</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ RE + e/ou RPg +</li> <li>▪ HER2 –</li> <li>▪ Ki-67 baixo (&lt;14%)</li> </ul>
<b>Luminal B HER2 -</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ RE + e/ou RPg +</li> <li>▪ HER2 –</li> <li>▪ Ki-67 alto</li> </ul>
<b>Luminal B HER2 +</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ RE + e/ou RPg +</li> <li>▪ HER2 sobreexpresado ou amplificado</li> <li>▪ Calquera Ki-67</li> </ul>
<b>HER2 + (non luminal)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ RE e RPg ausentes</li> <li>▪ HER2 sobreexpresado ou amplificado</li> </ul>
<b>Triplo negativo (ductal)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ RE e RPg ausentes</li> <li>▪ HER2 -</li> </ul>

Entre os factores relacionados co risco relativo de padecer cancro de mama en mulleres, inclúense a idade, hiperplasia atípica confirmada en biopsia, mutacións hereditarias nos xenes BRCA1 e/ou BRCA2, carcinoma ductal ou lobulillar *in situ* e diagnóstico de cancro de mama a idade temperá en dous ou máis parentes de primeiro grao (risco relativo >4.0) (13).

### **3.3.\_ Comunicación celular mediante canles de conexinas. Expresión e funcións das conexinas no tecido mamario**

Entre os distintos complexos proteicos que permiten o contacto célula-célula nos organismos salientan as *tight junctions* (“unións estreitas”), os desmosomas e as *gap junctions* (“unións *gap*, comunicantes ou nexus”). Ditas unións comunicantes favorecen a comunicación entre a célula e a matriz extracelular ou a comunicación directa entre células adxacentes,

facilitando o paso de diversos tipos de moléculas e compostos cun peso molecular de ata aproximadamente 1.2 KDa (metabolitos, ións, mensaxeiros, auga, impulsos eléctricos...) (21-24). Cada conexión consta de seis proteínas chamadas conexinas (Cxs) (Fig. 3). A subunidade proteica de conexina atópase formada por catro dominios transmembrana, con lazos ou *loops* extracelulares (2) e citoplásmicos (1 *loop*, o dominio N-terminal e o dominio C-terminal). Nos dous *loops* extracelulares encóntrase altamente conservada a orde de tres residuos do aminoácido cisteína (25).



**Figura 3.** Estrutura das unións comunicantes. Cada célula adxacente aporta unha hemicanle ou conexón para a formación da canle completa ou unión comunicante. Cada conexón atópase constituído por seis subunidades proteicas de conexina. As seis subunidades da hemicanle poden cambiar a súa configuración de forma coordinada para abrir ou pechar a hemicanle. Imaxe tomada e modificada de <https://cnx.org/contents/8Uypx7vu@7/Connections-between-Cells-and->

As conexinas están presentes en case todos os tipos celulares de mamíferos, presentando gran diversidade de tipos proteicos (20 en rato e 21 no ser humano) (Táboa II) (26-28). Incluso, dentro dun mesmo tecido ou tipo celular pódense expresar dous ou máis membros desta familia proteica. Por exemplo, os queratinocitos expresan a Cx26, Cx30, Cx30.3, Cx31, Cx31.1 e Cx43 (29, 30); os cardiomiocitos a Cx40, Cx43 y Cx45 (31) e os hepatocitos as Cx26 e Cx32 (32, 33). Sen embargo, cada

conexina desenvolve funcións específicas e non todas elas son reempazables por outro tipo de conexinas.

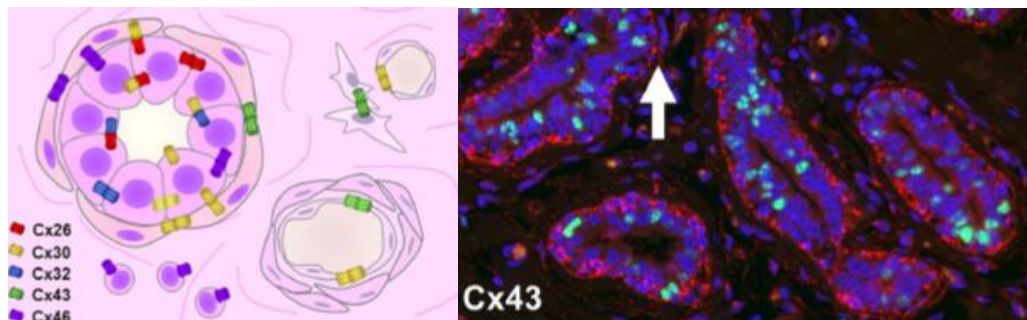
**Táboa II.** Familia de xenes das conexinas, denominación das *gap junctions* e a súa distribución cromosómica en humanos (*Homo sapiens*). Tomado de Söhl & Willecke, 2004 (25).

<b>Conexina</b>	<b>Gap junction</b>	<b>Cromosoma</b>
<b>hCx23</b>		6
<b>hCx25</b>		6
<b>hCx26</b>	GJB2	13
<b>hCx30.2</b>	GJE1	7
<b>(hCx31.3)</b>		
<b>hCx30</b>	GJB6	13
<b>hCx31.9</b>	GJA11	17
<b>hCx30.3</b>	GJB4	1
<b>hCx31</b>	GJB3	1
<b>hCx31.1</b>	GJB5	1
<b>hCx32</b>	GJB1	X
<b>hCx36</b>	GJA9	15
<b>hCx37</b>	GJA4	1
<b>hCx40.1</b>		10
<b>hCx40</b>	GJA5	1
<b>hCx43</b>	GJA1	6
<b>hCx45</b>	GJA7	17
<b>hCx46</b>	GJA3	13
<b>hCx47</b>	GJA12	1
<b>hCx50</b>	GJA8	1
<b>hCx59</b>	GJA10	1
<b>hCx62</b>		6

Mutacións nos xenes das conexinas 43 e 26 atópanse relacionadas cun importante número de enfermidades, tales como a xordeira neurosensorial non sindrómica, diversas enfermidades da pel (principalmente mutacións na Cx26) (34) e a displasia oculodentodixital (mutacións na Cx43) (35). Moitos estudos ademais clasifican o proceso inflamatorio e o cancro na categoría de patoloxías dependentes de conexinas pero non asociadas a mutacións ata agora descritas (36).

En canto á expresión de conexinas en tecido mamario san, aínda que ben descrita na glándula dos roedores, o seu coñecemento atópase limitado a estadios adultos non xestantes no caso humano dada a dificultade de

obtención doutros tipos de mostras (37). A Cx43 describiuse a nivel das células mioepiteliais dos principais ductos e lóbulos (Fig. 4) (38-43). Nalgúns casos reportouse a formación de unións comunicantes de Cx43 dispersas entre as células luminais (40, 42). Un estudo recente detectouna tamén nas células endoteliais e estromais (43). Outras conexinas presentes así mesmo no tecido mamario san son a Cx26, cuxa expresión nas células luminais é baixa e varía probablemente cos ciclos hormonais (40, 43); a Cx32 nas células luminais; a Cx30 nas células luminais, nas que colocaliza coa Cx26, e tamén se expresa nas mioepiteliais e na microvasculatura e a Cx46 nas células luminais, mioepiteliais e inflamatorias (43) (Fig. 4).



**Figura 4.** Localización das conexinas detectadas no tecido mamario san premenopáusico (imaxe esquerda), salientando a da conexina43 a nivel das células mioepiteliais (vermello) e células estromais adxacentes (frecha) (imaxe dereita). A cor azul atópase asociada a núcleos (DAPI) e a verde ao índice de proliferación Ki67. Imaxe tomada e modificada de Teleki *et al.*, 2014 (43).

As conexinas desempeñan diversas funcións no correcto desenvolvemento e homeostase da glándula mamaria sa. Está descrito que a Cx43 leva a cabo un papel na execución do leite durante a lactación no caso de modelos experimentais animais de ratos (44, 45), e en humanos é necesaria para o mantemento da diferenciación mioepitelial e pode presentar un rol relevante na función das células luminais (46). Ademais, en tecido humano mamario san, a Cx43 considérase un factor supresor de tumores, aportando protección fronte ao inicio do cancro de mama e/ou progresión do tumor primario (47). No entanto, o seu papel durante a metástase atópase suxeito a debate, sendo altamente variable



e dependente do grao tumoral, apuntando mesmo a un papel facilitador da mesma (46). Por exemplo, un estudo atopou expresión elevada de Cx43 en lesións tumorais invasivas en comparación con tecidos sans e lesións non invasivas (41), e outro determinou niveis incrementados de Cx43 en metástases de cancro mamario en nódulos linfáticos fronte ás cantidades máis inferiores achadas nos tumores primarios (48). Neste sentido, as unións comunicantes serían necesarias para a migración e invasión das células tumorais e a súa interacción coas endoteliais durante a intravasación e extravasación nas fases finais da tumoroxénese (49, 50).

Os resultados publicados por diferentes grupos de investigación parecen indicar que as conexinas actúan como supresores tumorais en tecido mamario san e en estadios neoplásicos iniciais (baixos niveis proteicos, que favorecerían o inicio da tumoroxénese), mentres que en cancros máis avanzados e metástases desempeñarían un papel oposto como facilitadoras do mesmo (altos niveis proteicos debido á súa reexpresión e/ou reconstitución), dependendo por tanto a súa función neta do estadio tumoral (49, 51). Sen embargo, segue a existir gran controversia sobre a función desta proteína, tanto nas fases de inicio, progreso como no proceso de metástase, polo que se plantexa o presente proxecto co fin de profundizar nesta materia.

### **3.4.\_ Tratamento do cancro de mama e alteracións na cicatrización cutánea. Función das conexinas en pel**

Entre as opcións actuais para o tratamento do cancro, a radioterapia destaca polos importantes efectos secundarios que supón na estrutura, función e capacidade de cicatrización da pel, afectando en gran medida á calidade de vida das pacientes afectadas. Estímase que aproximadamente un 60% dos doentes diagnosticados de cancro serán tratados con radioterapia nalgún estadio da enfermidade (52). A radioterapia é unha técnica de tratamento localizado, empregada en solitario ou conxuntamente con outros procedementos (i.e. cirurxía,

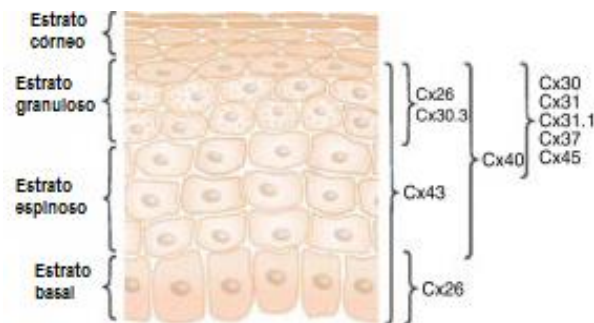
quimioterapia), na que se administran radiacións ionizantes de alta enerxía que alteran o ADN das células. Como resultado, detense a replicación celular maligna, pero tamén se producen altas cantidades de radicais libres que deterioran os tecidos sans, entre os que se atopa a pel (53). Deste modo, a cicatrización cutánea vese severamente afectada por este tipo de tratamento, incluíndose entre os efectos a longo prazo a atrofia cutánea, fibrose de tecidos brandos e dano microvascular, polo que habería un maior risco de desenvolver feridas críticas non cicatrizantes (54).

Outra alternativa para o tratamento do cancro é a quimioterapia (aplicada en solitario ou conxuntamente con radioterapia e cirurxía), na que se empregan diversos tipos de axentes que teñen como diana primaria as células tumorais altamente proliferativas. No entanto, outros tipos celulares sans que presenten altas taxas de recambio (e.g. macrófagos e fibroblastos implicados na cicatrización da pel) tamén se poden ver afectados (55). Entre estes axentes quimioterapéuticos, observouse que algúns compostos alquilantes inhibidores do ciclo celular, particularmente a ciclofosfamida (Cytosan), inhiben a cicatrización da pel ao atenuar a vasodilatación inicial e subseguinte neovascularización características da fase proliferativa da cicatrización cutánea (56-58). Antibióticos antitumorais como a bleomicina (Blenoxan) reducen a produción de coláxeno por parte dos fibroblastos da pel, afectando así á estrutura e rexeneración ou cicatrización da mesma (59).

As conexinas desempeñan un importante papel na fisioloxía do tecido cutáneo, evidenciado pola expresión de múltiples tipos proteicos na pel e apéndices cutáneos, así como polo elevado número de enfermidades cutáneas asociadas a mutacións nos xenes das conexinas (60). Así mesmo, xogan un rol de gran relevancia na cicatrización cutánea (61-63). Os fibroblastos dérmicos expresan como conexina maioritaria a Cx43, e atópanse conectados mediante unións comunicantes (64). As células epiteliais e queratinocitos expresan diferentes conexinas, sendo estas

reguladas no epitelio da ferida e nas marxes da mesma de xeito diferencial e temporal durante o proceso de cicatrización (65, 66).

As conexas 26, 30, 31, 37, 40, 43, e 45 preséntanse ao longo de todas as capas da epiderme (67), coa excepción do estrato córneo (68, 69), e solápanse a súa expresión en certos estratos (Fig. 5). A Cx43 maniféstase en todas as capas epidérmicas, e os maiores niveis da mesma atópanse no estrato granuloso (Fig.5) (70).



**Figura 5.** Expresión das conexas na epiderme da pel, apreciándose o solapamento das mesmas en certos estratos. Imaxe tomada e modificada de Mese *et al.*, 2007 (67).

Os obxectivos do presente Traballo de Fin de Mestrado son:

- Estudo dos niveis e implicación da Cx43 no desenvolvemento e progreso do cancro de mama: estudo dos niveis proteicos e localización celular nos diferentes subtipos de cancro de mama (luminal A, luminal B HER2+, luminal B HER2-, HER2+ e triplo negativo) e comparación con tecido mamario san (control).
- Estudo da participación da Cx43 no proceso de reparación e cicatrización cutánea en pacientes sometidas a quimioterapia e/ou radioterapia.

## **4.\_ MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1.\_ Ensaio inmunohistoquímico de tecido mamario, cutáneo e ganglionar de pacientes dos diversos subtipos de cancro de mama sometidas a diversos tratamentos**

Leváronse a cabo inmunohistoquímicas contra a Cx43 en mostras de tecido mamario san (doante san), tumoral, san (non afectado) adxacente inmediato ao tumor, san (non afectado) adxacente non inmediato, ganglio e pel procedentes de (i) pacientes non sometidas a tratamentos previos (tumor Phyllodes maligno) e (ii) con cancro de mama dos subtipos triplo negativo (sen quimioterapia e postquimio), luminal A, luminal B (sen quimioterapia e postquimio) e HER2+ (sen quimioterapia e postquimio). Os tecidos orixinais obtivéronse a partir de operacións de simetrización mamaria e xigantomastia (tecidos sans) e intervencións cirúrxicas asociadas ao tratamento das neoplasias mamarias (mastectomía, colocación/substitución de próteses), dispendo do consentimento informado de cada doente (modelos de documento informativo e consentimento informado en Anexos 1 e 2, respectivamente). Pertencen á colección privada de mostras biolóxicas humanas autorizada polo Comité Autonómico de Ética de Investigación de Galicia (CAEIG) con código de rexistro 2015/029 (C.0003333 - Rexistro Nacional de Biobancos do ISCIII). Recolléronse en botes con formol de forma inmediata á cirurxía, e incluídos en parafina para a realización de bloques, os cales foron posteriormente seccionados nun micrótopo de rotación (Leica RM2155). Os cortes obtidos deixáronse flotar nun baño de auga para despois adherilos a un portaobxectos de cristal, colocándoos posteriormente nunha estufa a 37º para secar. Previamente á inmunohistoquímica, os cortes coas mostras foron desparafinados nunha batería de xilenos e etanol (catro tempos en xileno e un en etanol 100º, 10 minutos cada un; Panreac Química SAU), e hidratados noutra de alcois de gradación decrecente (etanol 100º, 96º e 80º, auga destilada; 10 minutos en cada pase). Para o ensaio inmunohistoquímico laváronse con PBS (tampón

fosfato salino) con Tween 20 (Sigma) ao 0.1% (PBST, tampón fosfato salino con Tween 20) durante 5 minutos. Engadiuse un inhibidor da peroxidasa endóxena (OptiView Peroxidase Inhibitor, Ventana Medical Systems) durante 10 minutos, e laváronse de novo con PBST por 30 minutos (tres lavados de 10 minutos). Engadiuse o anticorpo primario anti-Cx43 en dilución 1:200 en PBST (coello anti-Cx43, Sigma C6219) e deixouse durante 1 hora a temperatura ambiente nunha cámara húmida. A continuación realizáronse lavados con PBST durante 30 minutos (tres lavados de 10 minutos) e engadiuse o anticorpo secundario (OptiView HQ Universal Linker, Ventana Medical Systems) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Tras lavar con PBST 20 minutos, aplicouse un multímero marcado con peroxidasa que amplifica o sinal da inmunohistoquímica (OptiView HRP Multimer, Ventana Medical Systems) durante 8 minutos. Lavouse de novo con PBST 20 minutos e para revelar a actividade peroxidasa engadiuse unha mestura en proporción 1:1 de DAB ao 0.2% (diaminobenzidina, OptiView DAB, Ventana Medical Systems) e auga osixenada ao 0.04% (OptiView H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Ventana Medical Systems) durante menos dun minuto. Parouse a reacción con auga destilada, coa que se lavou durante 30 minutos (tres lavados de 10 minutos). Secáronse os portaobxectos en torno á mostra e contratinguíronse con hematoxilina de Gill III (Merck) no caso de mostras de tecido mamario ou ganglionar, ou solución de Giemsa ao 5% en auga destilada a partir dun stock de azur-eosina-azul de metileno en solución segundo Giemsa (Merck) para tecido cutáneo. A hematoxilina tingue os núcleos de azul escuro-violeta, mentres que a Giemsa coloreia de azul escuro os núcleos e a melanina de verde escuro a negro verdoso. Utilizouse Giemsa nos tecidos cutáneos en troques de hematoxilina, xa que con esta a melanina e o sinal asociado á presenza de Cx43 resultarían da mesma cor (marrón escura), mentres que co Giemsa pódense distinguir correctamente (melanina en negro verdoso e Cx43 marrón). A hematoxilina deixouse 2 minutos e virouse con auga da billa, posteriormente deshidratando as mostras nunha batería de alcois de

gradación crecente (auga destilada, etanol 80°, etanol 96°, etanol 100°, xileno; 10 minutos en cada un). O Giemsa mantívose 5 minutos, e logo deshidratouse en etanol de 96° e 100° (2 pases rápidos en cada un), deixándose finalmente en xileno. Para rematar, montáronse os portaobxectos con medio de montaxe Eukitt® (Sigma-Aldrich) e puxéronse a secar en vertical a temperatura ambiente. Posteriormente observáronse e fotografáronse a diferentes aumentos nun microscopio Olympus BX61.

## **4.2.\_ Fibroblastos dérmicos procedentes de pacientes sometidas a radioterapia e quimioterapia**

### **4.2.1.\_ Obtención de mostras cutáneas e cultivo primario de fibroblastos dérmicos**

Obtivéronse biopsias de tecido cutáneo de pacientes femininas do Complexo Hospitalario Universitario de A Coruña - Xerencia Xestión Integrada A Coruña (CHUAC-XXIAC) sans e con cancro de mama (subtipos HER2+, Luminal B HER2- e Luminal A) e tumor Phyllodes maligno (control), sometidas a diversos tipos de tratamentos (radioterapia, quimioterapia, hormonoterapia, anticorpos) e sen tratamentos previos. As mostras procedían de operacións cirúrxicas de simetrización mamaria, mastectomía e colocación de prótese (expansor), e contouse previamente co consentimento informado asinado de cada unha das doentes (modelos de documento informativo e consentimento informado en Anexos 1 e 2, respectivamente). Pertencen á colección privada de mostras biolóxicas humanas autorizada polo CAEIG (2015/029 C.0003333).

Cada mostra de tecido foi recollida nun bote de plástico estéril e trasladada de inmediato ao laboratorio para o seu procesado. Nunha campá de fluxo laminar eliminouse a graxa da hipoderme de cada peza de pel coa axuda dun bisturí. A continuación segmentouse cada mostra de epiderme en anacos de aproximadamente 1X1 cm (explantes). Raiouse cun bisturí unha placa Petri adherente de 100 cm<sup>2</sup> (Corning®) a

modo de cuadrícula, e colócase cada un dos explantes nas interseccións resultantes coa epiderme cara arriba e a derme en contacto coa placa. Deixáronse na estufa de cultivo celular a 37° C durante 5 minutos para favorecer a súa adhesión. Despois engadiuse pouco a pouco o medio de cultivo *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM, Invitrogen Life Technologies) suplementado con 20% de soro bovino fetal (FBS) e 1% de penicilina/estreptomicina (100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina; Gibco, Invitrogen Corporation), e deixáronse as placas cos explantes na estufa de cultivo celular durante 48 horas, a 37° C, 5 % CO<sub>2</sub> e saturación de humidade. Tras este tempo analizouse a proliferación dos fibroblastos en cada unha delas; nos casos en que había un número celular axeitado desbotáronse os explantes e continuouse co cultivo na mesma placa ate acadar unha confluencia do 70-80%, momento no que se transferiron a unha nova placa adherente sen raiar de 100 cm<sup>2</sup> empregando DMEM con FBS ao 10%. En caso de que o número de fibroblastos fora moi escaso ou inexistente, centrifugáronse os explantes e botáronse nunha nova placa adherente raiada de 100 cm<sup>2</sup> con DMEM con FBS ao 20% para favorecer o seu crecemento, repetindo os pasos anteriormente mencionados.

#### **4.2.2.\_ Estudo do fenotipo fibroblástico**

Para levar a cabo o estudo do fenotipo celular, cultivos primarios nunha confluencia do 80% observáronse nun microscopio invertido Nikon Eclipse Ti (luz visible), realizando o fotografado pertinente.

#### **4.2.3.\_ Electroforese desnaturizante en xel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e Western Blot**

##### **4.2.3.1.\_ Preparación das mostras**

Recolléronse os pellets celulares dos distintos fibroblastos dérmicos en cultivo, deixáronse repousar en xeo e lisáronse en 500 µL de solución de lise fría con Triton-X-100 0.1%, Tris 10 mM pH 7.5, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 1 mM, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 1 mM e un cóctel de inhibidores de proteasas. Para a lise das

células empregáronse primeiro puntas de pipeta e logo agullas de insulina finas, recollendo con elas a mestura de extractos celulares con buffer de lise ao menos 10 veces. Fíxose unha alícuota de 50  $\mu$ L de cada mostra nun *tubo Eppendorf Low Protein Bind* (Eppendorf  $\text{\textcircled{R}}$ ) á que se engadiu buffer de carga 1X (10% dodecilsulfato sódico –SDS–, 200 mM Tris-HCl pH 6.8, 50% glicerol, 0.1% azul de bromofenol, 10%  $\beta$ -mercaptoetanol). Vortearóonse as mostras e deixáronse a 100°C 10 minutos para completar a desnaturalización. A continuación cargáronse cantidades de cada mostra (previamente axustadas mediante a realización dun xel de prata) en xeles de acrilamida/bisacrilamida ao 10% de 1 mm de grosor. Ditos xeles están formados por unha sección separadora e outra concentradora. O separador componse a partir de 3.33 mL de acrilamida/bisacrilamida 30% (Sigma-Aldrich), 4.68 mL de auga destilada, 1.88 mL de Tris 2 M pH 8.8, 100  $\mu$ L de SDS 10%, 25  $\mu$ L de PSA 20% e 12  $\mu$ L de TEMED. O concentrador elabórase con 400  $\mu$ L de acrilamida/bisacrilamida 30%, 2.2 mL de auga destilada, 375  $\mu$ L de Tris 2 M pH 8.8, 30  $\mu$ L de SDS 10%, 12  $\mu$ L de PSA 20% e 3  $\mu$ L de TEMED.

#### **4.2.3.2.\_ Electroforese desnaturalizante**

Trala carga das mostras nos xeles de poliacrilamida, separáronse as proteínas segundo o seu peso molecular mediante electroforese (SDS-PAGE, electroforese en xel de poliacrilamida con dodecilsulfato) a 80 voltios durante 90 minutos nunha cubeta (Bio-Rad) con tampón de electroforese 1X (elaborado a partir de tampón 10X: 30.3 g Tris-Base, 144 g glicina, 10 g SDS, 1 L auga destilada).

#### **4.2.3.3.\_ Transferencia**

Unha vez separadas as proteínas, transferíronse a membranas de polifluoruro de vinilideno de 7X8 cm (Life Technologies), activadas anteriormente en metanol e auga destilada (5 minutos en metanol, 5 minutos en auga, 5 minutos en metanol, 5 minutos en auga). Levouse a cabo transferencia húmida nun Trans-Blot (Bio-Rad) a 100 V durante 1 hora, empregando tampón de transferencia 1X frío elaborado a partir dun



stock 10X (15.1 g Tris-Base, 72 g glicina, 1 L auga). Tras este paso bloqueáronse as membranas coas proteínas transferidas durante 1 hora en axitación con leite ao 5% en TTBS 1X (tampón de lavado con Tween20, formado por 100 mL TBS 10X, 900 mL auga, 500 µL Tween 20) elaborado a partir dun stock de TBS 10X (2 mM Tris-Base, 150 mM NaCl, 1 L auga destilada, pH 7.6). Incubáronse en axitación a 4°C ata o día seguinte con anticorpo primario anti-Cx43 (coello, dilución 1:1000, Sigma) e anti- $\alpha$  tubulina (rato, 1:10000, Sigma) ou anti-GAPDH (rato, 1:3000, Sigma) (controis de carga) nunha solución que contiña 1 mL de leite ao 5% e 2 mL de TTBS 1X por cada membrana. Á mañá seguinte fixéronse lavados das membranas con TTBS 1X en axitación durante 40 minutos (lavados de 8-10 minutos), incubándose logo 1 hora en axitación a temperatura ambiente con anticorpo secundario conxugado con peroxidasa (anti-coello no caso da Cx43, dilución 1:1000, e anti-rato para os controis de carga, dilución 1:10000, Sigma) nunha solución con 1 mL de leite ao 5% e 2 mL de TTBS 1X por cada membrana. Trala incubación volvéronse facer lavados durante 40 minutos con TTBS 1X en axitación, e revelouse a membrana utilizando un kit de quimioluminiscencia (Luminata TM Classic Western HRP Substrate), visualizando os resultados nunha cámara LAS3000 (Fujifilm).

#### **4.2.4.\_ Estudo da funcionalidade das *gap junctions* de Cx43: ensaios de transferencia de marcadores fluorescentes**

##### ***Scrape-loading***

Coa finalidade de analizar a capacidade dos fibroblastos dérmicos de establecer *gap junctions* funcionais, realizouse un ensaio de *scrape loading*, baseado no *scrape* ou raspado de células en cultivo en presenza dun marcador fluorescente, permeable ás *gap junctions* e impermeable ao paso a través das membranas. Deste xeito, o marcador é incorporado polas células ao longo da liña de *scrape* debido ao dano provocado nas súas membranas. A medida que a permeabilidade celular é recuperada, o

marcador fica atrapado no citoplasma e pode chegar a difundir a células próximas só a través de *gap junctions* funcionais.

Para este ensaio cultiváronse os diferentes fibroblastos dérmicos en placas de 12 pocillos ata acadar unha confluencia do 90%. A continuación laváronse un par de veces con PBS (CorpoGen), e engadiuse o marcador fluorescente *Lucifer Yellow* (LY, Cell Projects) ao 0.4 % en PBS. Fíxose un *scrape* ou raspado rectilíneo ao longo de cada un dos pocillos coa axuda dunha agulla fina, e deixouse incubar durante 3 minutos a 37°C. Lavouse posteriormente con FBS ao 10% en PBS e fixéronse as células con formaldehído ao 4% durante 5 min a temperatura ambiente. Tras retirar o formaldehído e lavar os pocillos con PBS, observáronse e levouse a cabo o fotografado baixo un microscopio de fluorescencia invertido Nikon Eclipse Ti, empregando o filtro de 440 nm.

### **Microinxección de marcadores fluorescentes**

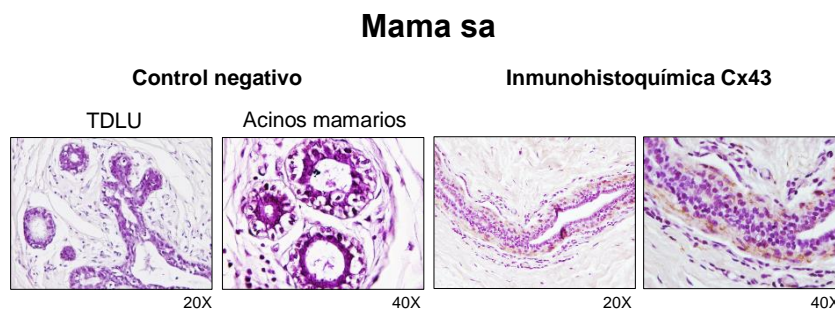
Co obxectivo de confirmar os resultados obtidos, realizouse unha segunda técnica para testar a habilidade dos fibroblastos dérmicos para formar *gap junctions* funcionais, mediante a microinxección dun marcador fluorescente, técnica que se levou ao cabo no laboratorio do Dr. Luis C. Barrio (Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria, Madrid) debido á necesidade de infraestruturas das que non se dispoñe no INIBIC. Partindo dunha monocapa de células confluentes, microinfectouse intracelularmente nunha única célula *Lucifer Yellow* (Cell Projects) ao 5% en LiCl 0.3 M como descrito en Martin *et al.*, 1998 (71). Ás dúas semanas examináronse nun microscopio de fluorescencia cun filtro de 440 nm e recontouse o número de células que transferían o marcador ás veciñas, determinándose así o grao de acoplamento celular.

## 5.\_ RESULTADOS

### 5.1.\_ Niveis proteicos e localización celular da Cx43 en mama de pacientes con diferentes subtipos de cancro de mama suxeitas a diversos tratamentos e comparación con tecidos control

Para levar a cabo o estudo dos niveis e localización da Cx43 realizáronse inmunohistoquímicas utilizando diferentes tecidos asociados aos diversos subtipos de cancro mamario así como controis de mama sans.

A continuación descríbense os resultados obtidos durante este traballo de mestrado pendente da análise cuantitativa e á espera de aumentar o tamaño mostral. No tocante á mama sa, as inmunohistoquímicas contra a Cx43 realizadas en tecidos sans procedentes dunha paciente (operación de xigantomastia), revelaron positividade para esta proteína a nivel das membranas e citoplasma das células mioepiteliais (Fig. 6, Inmunohistoquímica Cx43). Na figura 6 pódese así mesmo observar un control negativo amosando diferentes rexións do tecido mamario, salientando unha TDLU cos seus característicos ductos terminais intralobulillar e extralobulillar e *clusters* de acinos mamaros, distinguíndose neles as células mioepiteliais e ductais/luminais.

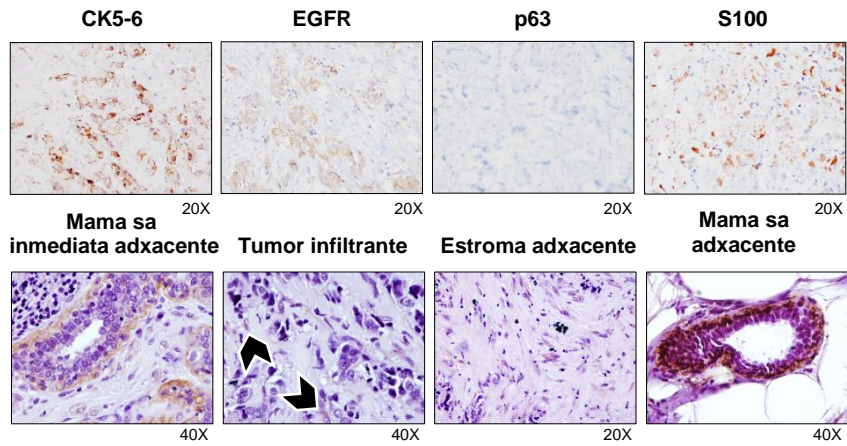


**Figura 6.** Estudo dos niveis e localización da Cx43 en mostras de tecido mamario san obtido a partir dunha operación de xigantomastia. Móstrase un control negativo e inmunohistoquímica contra Cx43 con contratinguidura de hematoxilina.

O subtipo triplo negativo (Fig. 7A), obtido a partir de mostras dunha paciente, caracterizouse por presentar niveis proteicos elevados na mama sa adxacente inmediata ao tumor, así como na mama sa adxacente non inmediata ao mesmo. En ambos casos a Cx43 atopouse claramente limitada á capa de células mioepiteliais, sobre todo a nivel membranoso. As células malignas do tumor infiltrante resultaron negativas para a Cx43, coa excepción dalgunhas células minoritarias onde se observou unha lixeira positividade (posiblemente a nivel citoplasmático; marcadas con puntas de frecha na Fig. 7A). Neste caso, para confirmar a procedencia do tumor empregáronse catro marcadores basais inmunohistoquímicos (CK5-6, EGFR, p63 e S100), cuxas interpretacións permitiron concluír a orixe basal do mesmo. A análise do estroma tumoral posibilitou detectar algúns fibroblastos e células con positividade para a Cx43. Na figura 7B pódense observar imaxes representativas pertencentes a mostras dunha segunda paciente con subtipo tumoral triplo negativo e carcinoma bilateral, pero a diferenza da anterior sometida a tratamento con quimioterapia. En primeiro termo aprécianse imaxes da mama dereita prequimio, amosando positividade para a Cx43 moderada na mama sa adxacente inmediata ao tumor (células mioepiteliais, nivel de membrana), débil na rexión de tumor infiltrante (nivel citoplasmático) e negatividade no estroma tumoral. A continuación pódense ver figuras representativas da mama esquerda tralo tratamento con quimioterapia, á que respondeu parcialmente, ficando un carcinoma residual. A mama sa adxacente inmediata ao tumor amosa niveis moderados da proteína respecto ao control de mama sa (Fig. 6), mentres que a mama sa adxacente non inmediata presenta unha positividade heteroxénea (rexións negativas e rexións con positividade moderada/elevada). Ámbalas dúas exhiben o sinal a nivel das membranas das células mioepiteliais. Tanto o tumor infiltrante residual como o estroma adxacente evidencian positividade feble a nivel citoplásmico. Nesta mostra observouse unha rexión con fibroadenoma (neoplasia benigna), permitíndonos a súa análise que resultou debilmente positiva para a Cx43 a nivel estromal.

# A

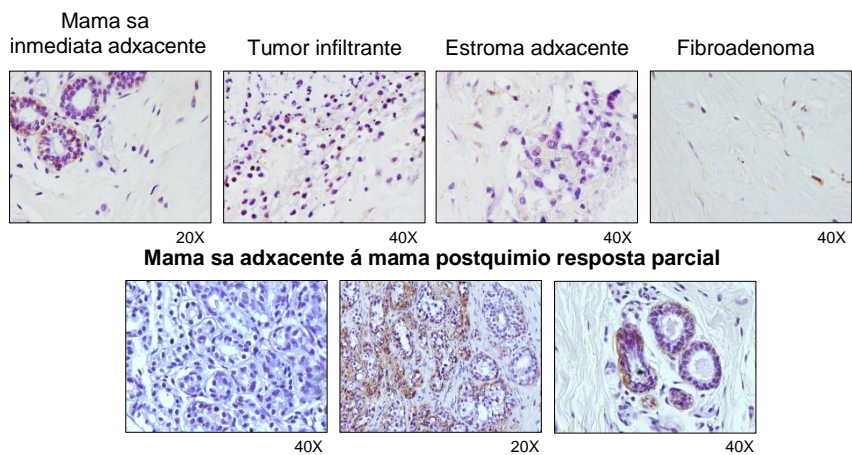
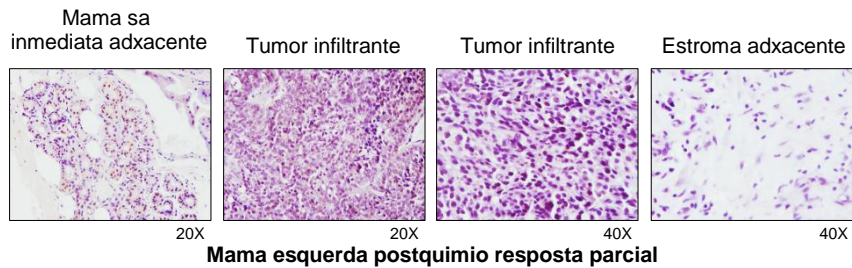
## Triplo negativo



# B

## Triplo negativo postquimio

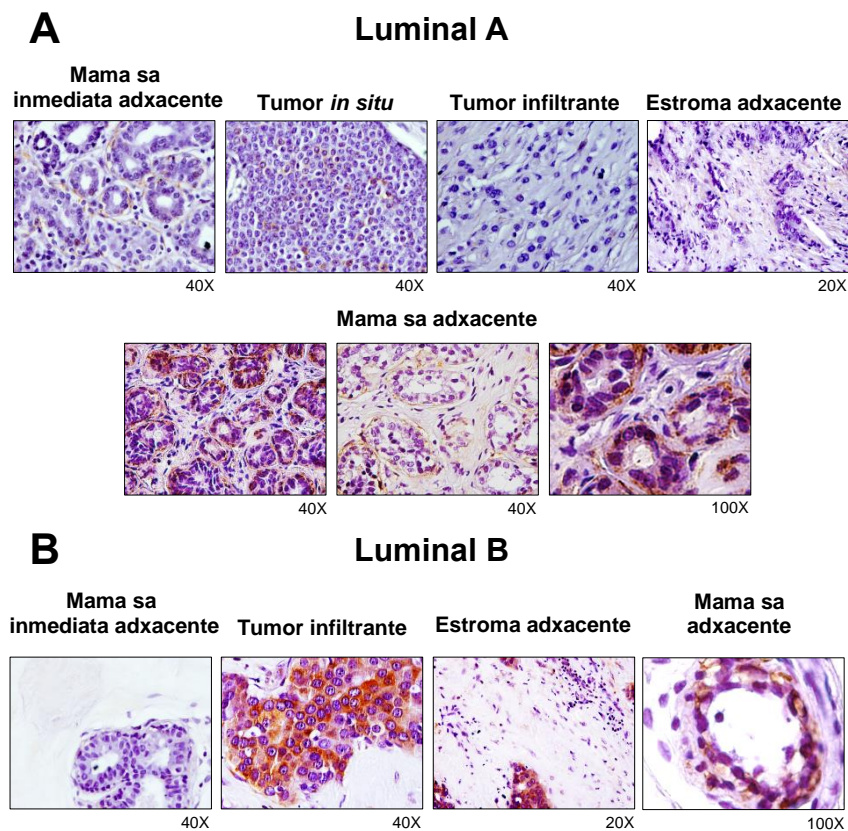
### Mama derecha prequimio



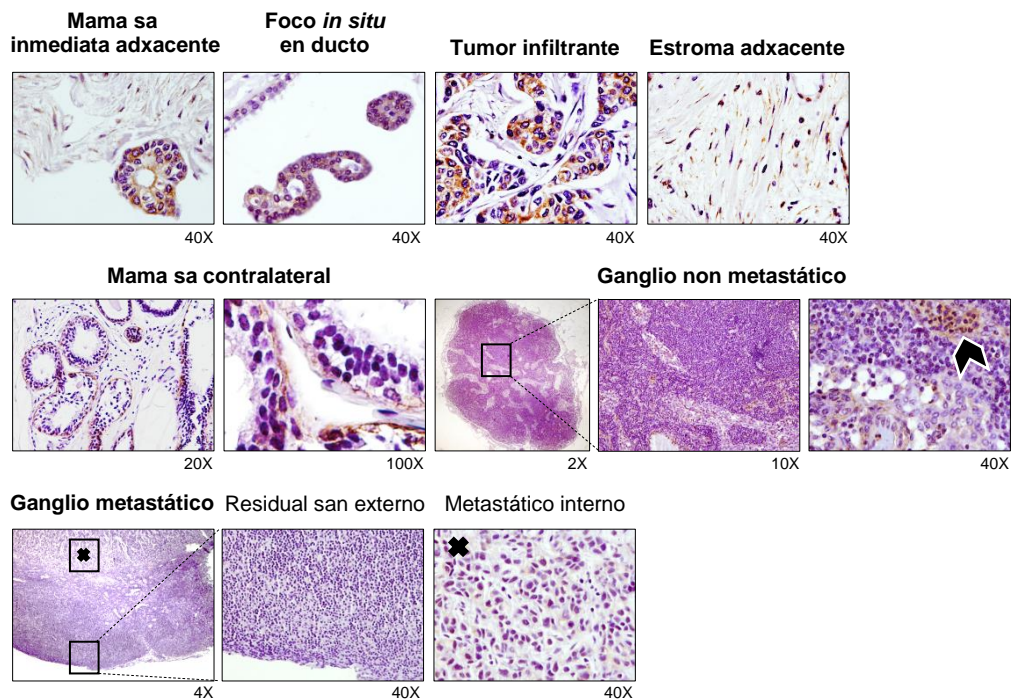
**Figura 7.** Estudo dos niveis e localización da Cx43 en mostras de tecido mamario procedentes de dúas pacientes co subtipo de cancro triplo negativo, unha sometida a quimioterapia e outra non. **A)** Expresión da Cx43 no subtipo triple negativo (mama sa inmediata adxacente ao tumor, mama sa adxacente, mama con tumor infiltrante e estroma mamario adxacente ao tumor), indicándose así mesmo marcadores inmunohistoquímicos empregados para a identificación de tumores con orixe nas células basais (CK5-6, EGFR, p63, S100). As puntas de frecha amosan células malignas do tumor infiltrante positivas para a Cx43. **B)** Expresión da Cx43 no subtipo triplo negativo tralo tratamento con quimioterapia, distinguindo entre a mama dereita prequimio (mama sa inmediata adxacente ao tumor, mama con tumor infiltrante e estroma mamario adxacente ao tumor), a mama esquerda postquimio con resposta parcial ao tratamento, resultando nun carcinoma residual (mama sa inmediata adxacente ao tumor, mama con tumor infiltrante e estroma mamario adxacente ao tumor, así como un fibroadenoma) e a mama sa adxacente. Inmunohistoquímicas contra Cx43 con contratinguidura de hematoxilina.

Na figura 8 recóllense imaxes relativas aos subtipos luminal A e B pertencentes a tres pacientes. O subtipo luminal A (Fig. 8A) amosou unha positividade moderada na liña mioepitelial na mama sa adxacente inmediata ao tumor, e elevada (respecto ao control san mostrado na Fig. 6) na adxacente non inmediata (nivel de membrana). Na rexión tumoral atopouse unha zona con infiltrante negativo e outra con *in situ* con positividade heteroxénea e débil a nivel citoplasmático nas células luminais. O estroma adxacente ao tumor revelou un sinal tenue. En canto ao luminal B (Fig. 8B), observouse unha positividade para a Cx43 moderada na mama sa adxacente non inmediata ao tumor (membrana das células mioepiteliais), que se contrapuxo á negatividade achada na mama sa adxacente inmediata ao mesmo. A rexión tumoral infiltrante presentou un sinal moi elevado de positividade para a Cx43 a nivel do citoplasma e nalgúns casos da membrana das células malignas, namentres que no estroma adxacente resultou máis moderado. Na figura 8C móstranse as imaxes correspondentes a outra paciente co subtipo luminal B tralo tratamento con quimioterapia, nas que se aprecian uns niveis moderados de proteína nas células ductais (membranas apical e basal) na mama sa adxacente inmediata, mentres que na mama sa contralateral a Cx43 encóntrase sita só a nivel mioepitelial (niveis moderados). A rexión tumoral estaba conformada maioritariamente por tumor infiltrante, o que indica que o tratamento con quimioterapia case non tivo efecto significativo. O sinal nesta zona era elevado, atopándose

positividade para a Cx43 no citoplasma e membranas das células malignas. Nunha pequena rexión achouse un foco de *in situ* nun ducto, mostrando positividade moderada a nivel citoplasmático. O estroma adxacente tumoral presentaba uns niveis moderados de proteína. Tívoise acceso a mostras dun ganglio sentinela metastático e outro non metastático desta paciente. O metastático amosou restos de ganglio san residual na periferia (sinal negativo), mentres que as células tumorais ficaban no interior formando estruturas a modo de niños (minoritariamente negativas e outras lixeiramente positivas para a Cx43). O ganglio non metastático, pola contra, mostrou unha estrutura organizada en cápsula, córtex e médula, con folículos linfáticos separados por seos histiocitarios. Detectouse positividade moderada puntual nestes seos, en linfocitos e neutrófilos (marcados cunha punta de frecha na figura 8C), non apreciándose positividade nas demais células (Fig. 8C)



## C Luminal B postquimio



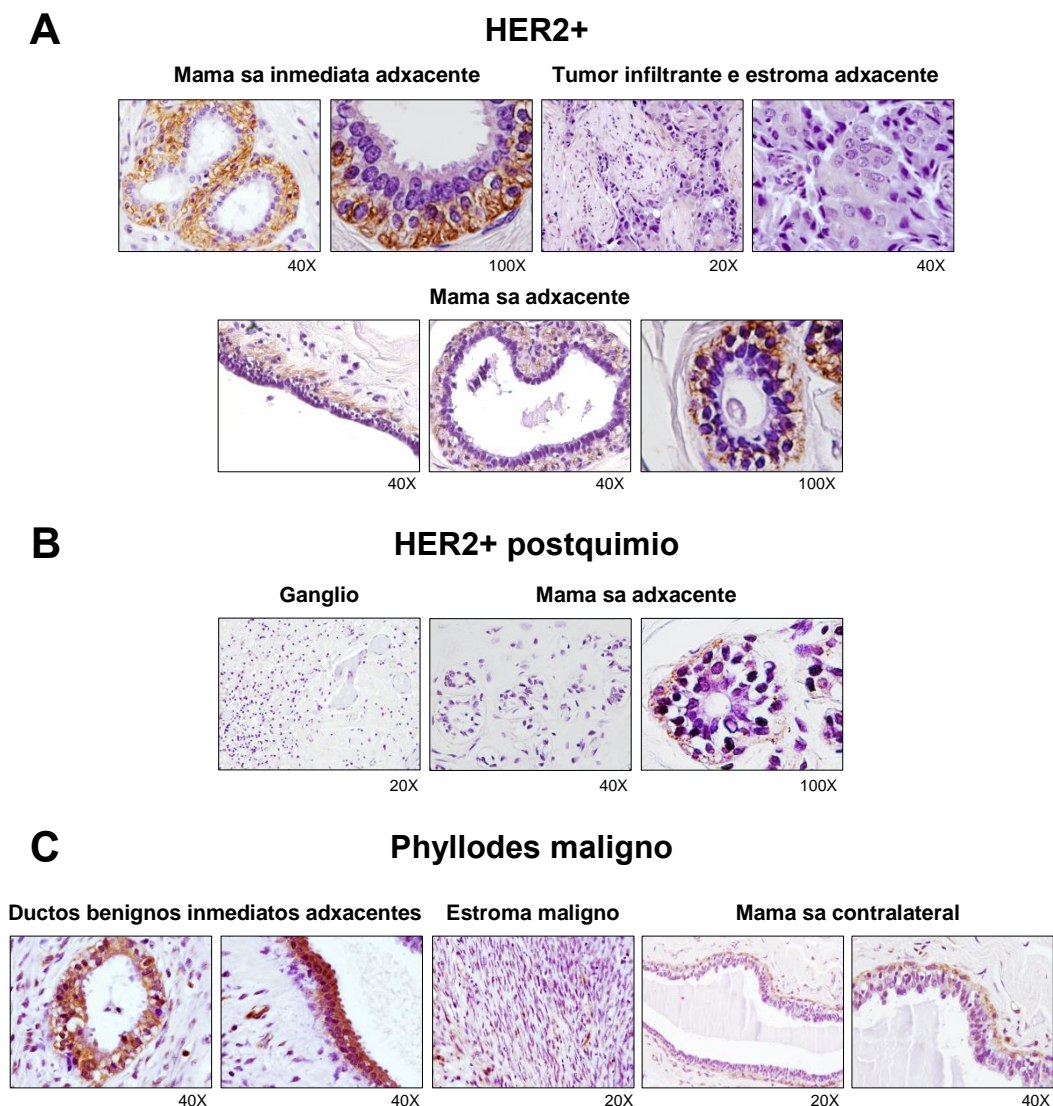
**Figura 8.** Estudo dos niveis e localización da Cx43 en mostras tisulares procedentes de tres pacientes cos subtipos de cancro luminal A e B (quimioterapia e sen quimioterapia). **A)** Expresión da Cx43 no subtipo luminal A (mama sa inmediata adxacente ao tumor, mama sa adxacente, mama con tumor *in situ* e infiltrante e estroma mamario adxacente ao tumor). **B)** Expresión da Cx43 no subtipo luminal B (mama sa inmediata adxacente ao tumor, mama sa adxacente, mama con tumor infiltrante e estroma mamario adxacente ao tumor). **C)** Expresión da Cx43 no subtipo luminal B tralo tratamento con quimioterapia, diferenciando a rexión tumoral (mama sa inmediata adxacente ao tumor, mama con tumor infiltrante e *in situ* -foco nun ducto- e estroma mamario adxacente ao tumor), a mama sa contralateral, o ganglio sentinela metastático (con ganglio san residual na periferia) e un ganglio non metastático. A punta de frecha indica un grupo de neutrófilos positivos para a Cx43. Inmunohistoquímicas contra Cx43 con contratinguidura de hematoxilina.

En canto ao derradeiro subtipo, HER2+, analizáronse mostras de dúas pacientes, unha con e outra sen tratamento de quimioterapia. No caso do subtipo HER2+ sen tratamento (Fig. 9A), observáronse tanto en mama sa adxacente inmediata como non inmediata niveis elevados de Cx43 (respecto ao control san, Fig. 6), ben delimitada na capa de células mioepiteliais (entre membranas). Pola contra, tanto a rexión tumoral infiltrante como o seu estroma adxacente amosaron negatividade para dita proteína. O mesmo subtipo trala quimioterapia (Fig. 9B), presentou negatividade para un ganglio postmetastático. A mama sa adxacente non



inmediata ao tumor mostrou de forma heteroxénea Cx43 en niveis moderados similares aos detectados no control san amosado na figura 6 (membrana das células epiteliais).

Por último, analizáronse mostras dunha paciente con tumor Phyllodes maligno de orixe no tecido conectivo estromal (neste caso non metastático) e non sometida a tratamento (Fig. 9C). A rexión tumoral (estroma maligno) manifestou niveis moderados de Cx43 na zona citoplasmática das células tumorais. A mama sa adxacente inmediata mostrou positividade elevada nas células ductais (membranas). Pola contra, a mama sa contralateral amosou cantidades similares aos detectados no control san da proteína (Fig. 6) entre as membranas das células mioepiteliais.



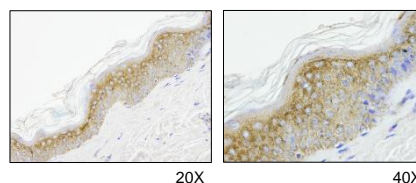
**Figura 9.** Estudo dos niveis e localización da Cx43 en mostras tisulares procedentes de dúas pacientes co subtipo de cancro HER2+ (quimioterapia e sen quimioterapia) e un control sen tratamento previo de tumor Phyllodes maligno. **A)** Expresión da Cx43 no subtipo HER2+. Mama sa inmediata adxacente ao tumor, mama sa adxacente, mama con tumor infiltrante e estroma mamario adxacente ao tumor. **B)** Expresión da Cx43 no subtipo HER2+ tralo tratamento con quimioterapia (ganglio e mama sa adxacente). **C)** Control de tumor Phyllodes maligno. Estroma maligno, parénquima benigno e mama contralateral sa. Inmunohistoquímicas contra Cx43 con contratinguidura de hematoxilina.

## 5.2.\_ Expresión da Cx43 en pel e fibroblastos dérmicos de pacientes sometidas a quimioterapia e radioterapia e comparación con pel non tratada

Analizáronse mostras de pel de pacientes con dous subtipos de cancro de mama sometidas a quimioterapia, e comparáronse con tecidos sans e/ou non suxeitos á terapia. Na figura 10A pódense apreciar cortes de pel sa procedentes dunha paciente operada de xigantomastia. A imaxe da inmunohistoquímica contra a Cx43 mostra a súa localización nos estratos lúcido, granuloso e espinoso da epiderme (cor marrón escura/negra). A expresión da Cx43 diminúe a medida que se avanza dos estratos superiores cara aos inferiores. Nos casos de cancro de mama subtipos triplo negativo e luminal B suxeitos a tratamento con quimioterapia (Fig. 10B), observouse unha diminución da amplitude de localización na epiderme para a proteína en comparación coas mostras dos mesmos subtipos procedentes de pacientes non sometidas á acción de quimioterapéuticos, así como con respecto aos controis (pel sa, Fig. 10A, e pel dunha paciente con Phyllodes maligno sen tratamento previo, Fig. 10B).

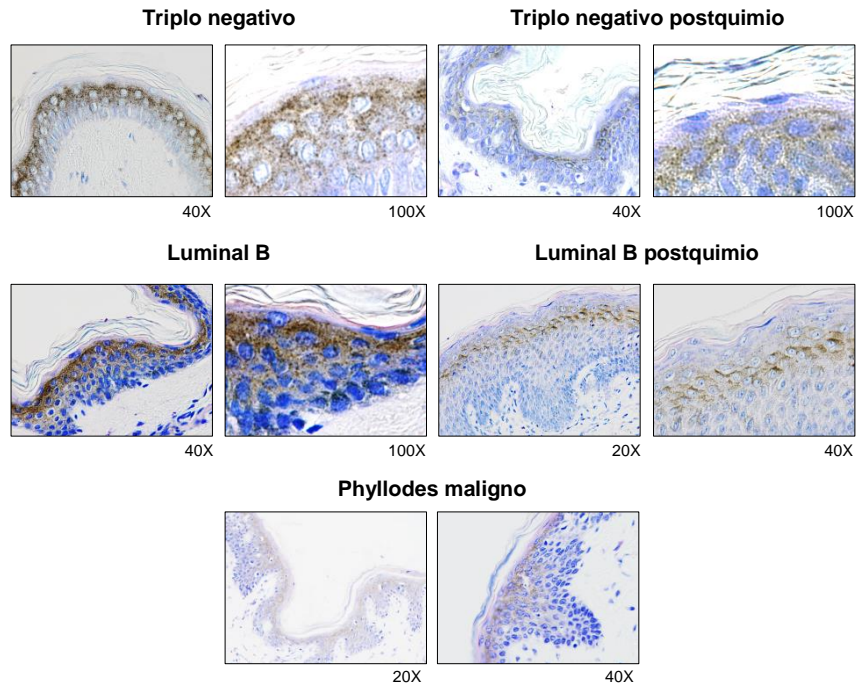
### **A** Pel sa xigantomastia

#### Inmunohistoquímica Cx43



## B

### Pel subtipos tumorais

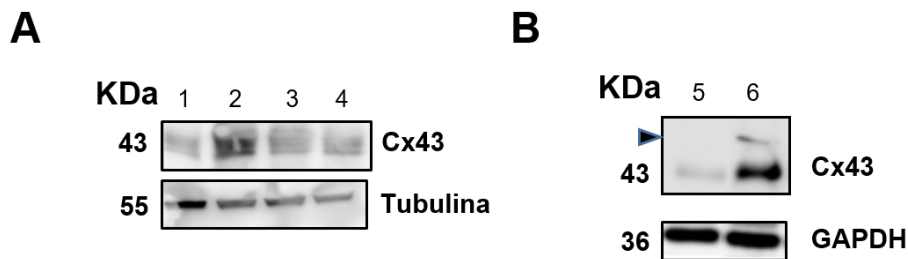


**Figura 10.** Estudo dos niveis de expresión e localización da Cx43 en mostras de tecido cutáneo san e de pacientes con cancro de mama. **A)** Expresión da Cx43 en mostras de tecido cutáneo san obtido a partir de operacións de xigantomastia. **B)** Expresión da Cx43 en mostras de pel de pacientes con diferentes subtipos tumorais (Triplo negativo e postquimio -2 pacientes-, Luminal B e postquimio -2 pacientes-), así como dun control de Phyllodes maligno sen tratamento previo. Inmunohistoquímica contra a Cx43 con tinguidura de Giemsa.

Analizouse así mesmo o patrón de expresión da Cx43 en fibroblastos dérmicos illados da pel de pacientes con cancro mamario sometidas a quimio e radioterapia mediante Western Blot, empregando como control de carga a  $\alpha$ -tubulina (peso molecular de 55 KDa) nun primeiro experimento e o GAPDH (peso molecular de 36 KDa) nun segundo ensaio, xa que tense demostrado que no caso de células sometidas a radiación pódense ver afectadas proteínas do citoesqueleto, tales como a tubulina (72). En ambos experimentos detectouse Cx43 na súa forma non modificada (peso molecular de 43 KDa), e os resultados obtidos suxiren que os fibroblastos procedentes de pel irradiada (mostras 2 e 6) presentan niveis considerablemente superiores de proteína que os fibroblastos provenientes de pel sa (mostras 1 e 5) e non sometida a ningún tratamento previo (mostra 4) (Figs. 11A e 11B). Adicionalmente

observouse Cx43 na banda de 53-58 KDa na mostra de pel radiada (marcada cunha frecha negra; mostra 6, Fig. 11B), mais non na de pel sa (mostra 5, Fig. 11B).

Tanto a pel sa (mostras 1 e 5) como a non tratada procedente dunha paciente con tumor Phyllodes maligno (mostra 4) amosaron niveis similares de Cx43 (Figs. 11A e 11B).

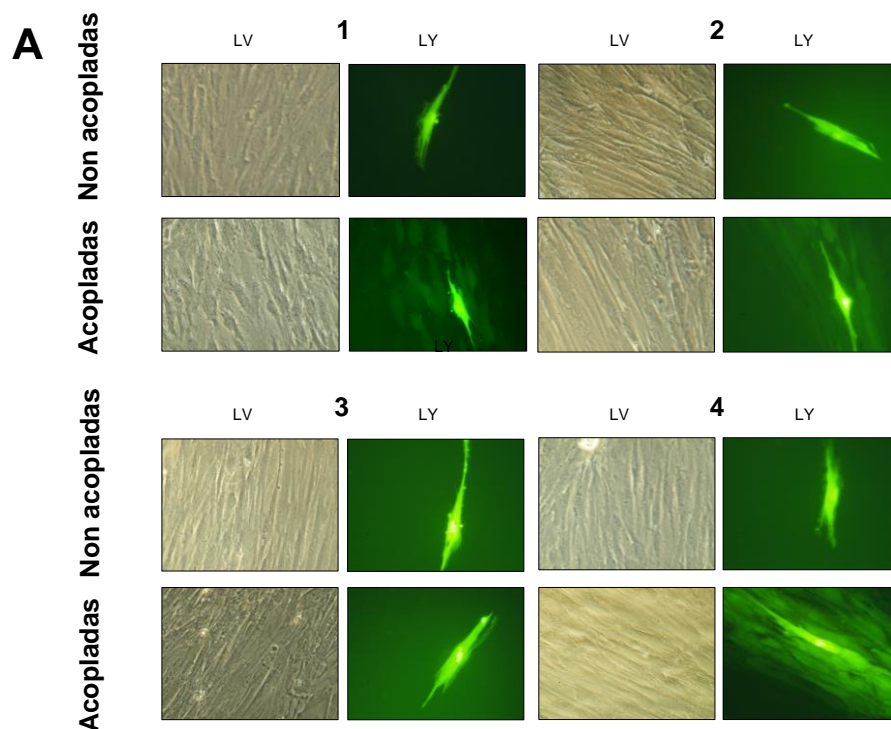


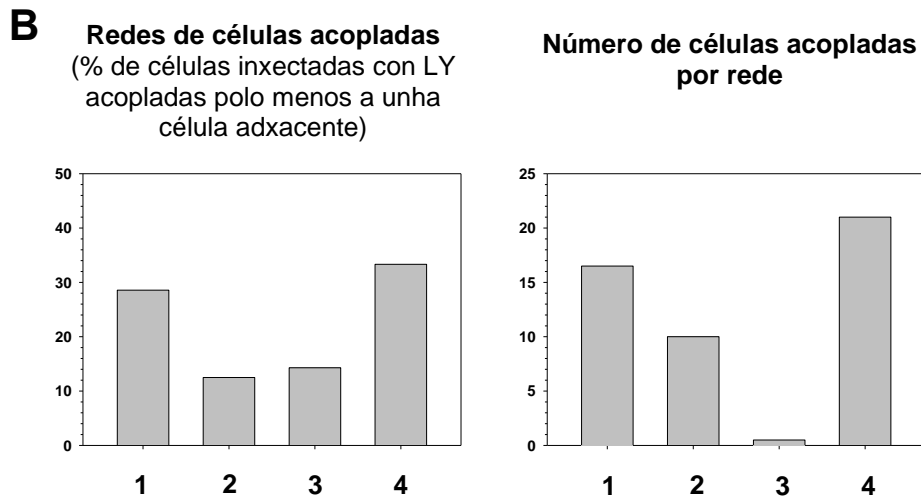
**Figura 11.** Estudo mediante Western Blot dos niveis proteicos de Cx43 en fibroblastos dérmicos procedentes de pacientes con diversos tipos de cancro de mama. **A)** Estudo dos niveis de Cx43 en fibroblastos provenientes de dúas pacientes con dous subtipos de cancro de mama sometidas a diferentes tratamentos, xunto cun control sen tratamento previo (Phyllodes maligno). **B)** Estudo dos niveis de Cx43 en fibroblastos procedentes de dúas mostras dunha paciente con cancro mamario subtipo luminal A: un control san (pel das costas) e pel da mama tumoral sometida a radioterapia. 1 – HER2+, Quimioterapia, Anticorpos, Non radioterapia. 2 – HER2+, Quimioterapia, Anticorpos, Radioterapia. 3 – Luminal B HER2-, Quimioterapia. 4 – Tumor Phyllodes maligno sen tratamento previo. 5 – Pel non radiada (costas). 6 – Pel irradiada da mesma paciente (mama tumoral, luminal A). Empregouse a tubulina como control de carga no primeiro caso (55 KDa) e o GAPDH no segundo (36 KDa).

### 5.3.\_ Funcionalidade das *gap junctions* e acoplamento celular en fibroblastos dérmicos de pacientes suxeitas a quimioterapia e radioterapia e comparación con fibroblastos de pel non tratada

Comparouse mediante ensaios de transferencia de *Lucifer Yellow* a capacidade da Cx43 de formar *gap junctions* funcionais nas diferentes mostras de pel procedentes de pacientes con cancro mamario suxeitas a quimio e radioterapia. A microinxección foi levada a cabo no laboratorio do Dr. Luis C. Barrio para confirmar os resultados obtidos no noso grupo utilizando *Scrape-loading*. Os resultados dos experimentos de microinxección de LY (Fig. 12A) amosaron niveis intermedios de acoplamento (redes de células acopladas, definidas como a porcentaxe

de células microinfectadas con LY acopladas polo menos a unha célula adxacente) nos fibroblastos da pel sen tratamento previo (mostra 4, paciente con tumor Phyllodes maligno), seguidos de preto polos fibroblastos da pel non radiada da paciente co subtipo de cancro HER2+ (mostra 1), e finalmente niveis moi baixos de acoplamento celular nos fibroblastos da pel de pacientes con cancro suxeitas a quimioterapia (mostra 3) e tratamento combinado de quimioterapia, anticorpos e radioterapia (mostra 2), presentando esta última valores máis reducidos (Fig. 12B). O número de células acopladas por cada rede revelou un patrón similar ao anterior, cos valores máis elevados no caso da pel sen tratamento previo (mostra 4) seguida de cerca pola pel non irradiada (mostra 1). A pel irradiada (mostra 2) amosou niveis moi inferiores de acoplamento celular. No entanto, a pel da paciente sometida só a quimioterapia (mostra 3) presentou os valores máis reducidos de número de células acopladas por rede. Estes datos coincidiron con resultados propios (non amosados no presente traballo) obtidos mediante ensaios de *Scrape-loading* nas mesmas mostras.



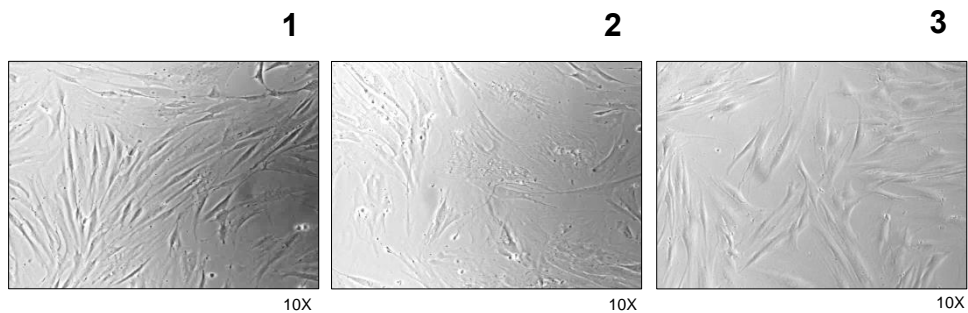


**Figura 12.** Análise da capacidade da Cx43 de formar unións comunicantes funcionais en fibroblastos dérmicos procedentes de pacientes con diversos subtipos de cancro de mama (HER2+, Luminal B) sometidas a diferentes tratamentos (quimioterapia, radioterapia, anticorpos) e un control non tratado (tumor Phyllodes maligno), en base á transmisión dun marcador fluorescente permeable ás *gap junctions* pero impermeable a nivel de membrana introducido mediante microinxección nunha única célula. **A)** Transferencia do marcador fluorescente *Lucifer Yellow* (LY) entre células contiguas a partir da célula microinxeccionada, comparación coa totalidade de células presentes en luz visible (LV) e distinción entre células acopladas e non acopladas mediante *gap junctions* funcionais. **B)** Análise cuantitativa da transferencia do marcador LY mediante determinación do número de redes celulares acopladas e o número de células acopladas por rede nas diversas mostras. 1 – HER2+, Quimioterapia, Anticorpos, Non radioterapia. 2 – HER2+, Quimioterapia, Anticorpos, Radioterapia. 3 – Luminal B HER2-, Quimioterapia. 4 – Tumor Phyllodes maligno sen tratamento previo. Obtivéronse resultados similares en experimentos propios mediante *Scrape loading* (resultados non amosados).

#### 5.4.\_ Análise fenotípica de fibroblastos dérmicos procedentes de pel radiada e sa

Estudouse ao microscopio en luz visible o fenotipo de fibroblastos dérmicos en cultivo obtidos a partir de mostras de pel de dúas pacientes, unha con tumor Phyllodes maligno non sometida a tratamentos previos (mostra 3), e outra con cancro mamario HER2+. Desta última dispuxemos de pel das costas (sa, non irradiada; mostra 1) e o peito (radiada; mostra 2). As células provenientes da pel sa e da non sometida a tratamento amosaron unha morfoloxía fibroblástica típica, alongada e fusiforme, cun citoplasma ramificado arrodeando un núcleo elíptico. Pola contra, os fibroblastos radiados manifestaron un fenotipo potencialmente

senescente, cun tamaño maior, citoplasma aplanado, e presenza de filamentos citoplasmáticos e granulacións (Fig. 13).



**Figura 13.** Análise fenotípico a luz visible de fibroblastos dérmicos procedentes de pacientes con diversos subtipos de cancro de mama suxeitas a diferentes tratamentos. 1 – HER2+, Quimioterapia, Anticorpos, Non radioterapia. 2 – HER2+, Quimioterapia, Anticorpos, Radioterapia. 3 – Tumor Phyllodes maligno sen tratamento previo.

## 6.\_ DISCUSIÓN

Dada a relevancia que nos últimos anos están a acadar as conexinas, e en particular a Cx43 na regulación da proliferación celular e no proceso de desenvolvemento e metástase do cancro de mama, o primeiro obxectivo do presente traballo foi analizar os patróns de localización e expresión da mesma en diversos subtipos de tecido mamario tumoral, sendo este o primeiro estudo en facelo deste xeito comparativo. Observáronse nos ensaios inmunohistoquímicos niveis xeralmente baixos (ou negativos) e relocalización da Cx43 a nivel citoplasmático na meirande parte das células tumorais nas zonas infiltrantes dos diferentes subtipos en comparación cos seus respectivos tecidos sans adxacentes (Figs. 7, 8A, 9A), o cal coincide con parte da bibliografía, e podería estar asociado a unha perda da comunicación intercelular entre as células tumorais (38, 42, 73). Porén, o subtipo luminal B (zona tumoral infiltrante) amosou uns niveis proteicos significativamente superiores aos demais subtipos (e control de paciente sa) e mesmo á súa mama sa adxacente, tanto inmediata como non inmediata, manifestándose a Cx43 a nivel de citoplasma e na membrana (Fig. 8B, 8C). A diferenza podería radicar na presenza na membrana plásmatica da Cx43 nas células tumorais do subtipo luminal B, fronte á localización maioritariamente citoplasmática

nos tumores infiltrantes dos outros subtipos, que conlevaría cambios nas funcións da Cx43 e alteracións na comunicación celular. Diversos estudos apoian que a expresión da Cx43 atópase correlacionada positivamente con tumores invasivos e metástases (46, 49, 74), onde a súa maior expresión tense demostrado que favorece a mobilidade celular e a invasión tisular (75). Sen embargo, as células necesitan diminuír os niveis da Cx43 para alterar a proliferación e fenotipo celular o que permitiría o desenvolvemento primario do tumor (74).

Seguindo coa localización da Cx43 en tecido mamario, no tocante ao tecido san (non tumoral) cómpre destacar que por regra xeral atopáronse niveis moderados de proteína nas membranas das células mioepiteliais da mama sa adxacente inmediata ao tumor e adxacente non inmediata, presentando nalgúns subtipos, tales como HER2+ (Fig. 9A), cantidades superiores da proteína respecto ao tecido mamario control dunha paciente sa (Fig. 6). Nestes casos a Cx43 podería estar exercendo a súa función protectora supresora de tumores en rexións adxacentes ou mama contralateral. Finalmente, é preciso salientar que na mama sa adxacente ao tumor en dous casos (luminal B postquimio, tumor Phyllodes maligno) detectouse a Cx43 nunha localización pouco revisada na bibliografía, a nivel das células ductais e non das mioepiteliais (Figs. 8C, 9C). Esta situación sería máis típica das Cxs 26, 30 e 32 (43), e tan só uns poucos traballos observaron dita proteína nestas células (42, 76). Realizaranse futuros estudos empregando un maior número de mostras e marcadores para poder caracterizar e estudar a función da Cx43 no caso de expresión a nivel das células ductais.

Os resultados obtidos a partir desta primeira análise permitíranos abrir unha nova liña de traballo co obxectivo de estudar a implicación da Cx43 no desenvolvemento e proceso de metástase nos diferentes subtipos de cancro de mama. Así mesmo, estes resultados abren unha nova estratexia de estudo tendo en conta os cambios detectados no estroma e zonas non tumorais destas pacientes. As células presentes nos tecidos



non tumorais amosan cambios na expresión e localización da Cx43 tanto entre subtipos como fronte a diferentes tratamentos. A comunicación da célula tumoral co seu microambiente xoga un papel esencial, modulando a evolución tumoral, modificando as respostas aos tratamentos e regulando o proceso de metástase (77). A ampliación deste estudo podería conlevar o descubrimento dun novo biomarcador de utilidade para o pronóstico dos subtipos de cancro e predición da resposta a diferentes tratamentos. Este aspecto será completado e estudado en detalle durante a tese de doutoramento.

Con respecto ao segundo obxectivo, este traballo tratou de tocar un problema clínico pouco explorado e moi frecuente en pacientes con cancro mamario sometidas a radioterapia e quimioterapia, nas que se evidencian graves problemas de cicatrización e alteracións na estrutura da pel a raíz destes tratamentos. Diversos estudos determinaron que baixos niveis non nocivos de radiación ionizante incrementaban os niveis da Cx43 e favorecían a comunicación intercelular; neles concretamente empregáronse radiacións medias de 0.16 cGy sobre unha liña celular de fibroblastos humanos (78), radiacións de ata 5 Gy en fibroblastos normais humanos e células HeLa (79) e valores de 10-20 cGy sobre varias liñas celulares tumorais (80). No entanto, no caso das pacientes con cancro de mama, a radiación á que son sometidas acadan niveis moi superiores aos empregados nos estudos anteriores e as alteracións e os mecanismos implicados están asociados a un entorno fisiolóxico a nivel tisular. Malia que se detectou mediante Western Blot un incremento moi significativo da Cx43 nas mostras de pel radiada con respecto a mostras de pel sa da mesma paciente e controis sans (Fig. 11), a comunicación e acoplamento celular por canles de Cx43 determinada mediante experimentos de microinxección de marcadores fluorescentes apareceu sensiblemente inferior (Fig. 12B). Isto se podería atribuír a que a proteína, aínda que sobreexpresada, non se atopa formando unións comunicantes funcionais, quizais por internalización da mesma. Demostrouse que a radiación ionizante provoca a entrada en senescencia prematura das células (81), o

que desembocaría na incapacidade de expresión dos xenes requiridos para a proliferación celular. Deste xeito poderíase relacionar co fenotipo senescente que parece observarse nos fibroblastos de pel irradiada (Fig. 13; resultados pendentes de confirmación) e coas dificultades de cicatrización cutánea, tamén asociadas ao acoplamento celular deficiente previamente mencionado.

Tense descrito diversas modificacións postraducionais da Cx43 tales como a fosforilación ou SUMOilación. Este tipo de alteracións regulan a ensamblaxe da Cx43 en unións comunicantes, a vida media da proteína, a apertura/peche das canles, etc. As bandas observadas no experimento de Western Blot (Fig. 11B) suxiren a presenza de modificacións postraducionais da Cx43 nos fibroblastos dérmicos irradiados, alterando por tanto as funcións da proteína.

No tocante ao tratamento con quimioterapia, os experimentos de microinxección de marcadores fluorescentes determinaron baixos niveis de acoplamento entre os fibroblastos dérmicos de pacientes sometidas a quimioterapia, que ademais foron os que mostraron menor número de células acopladas por rede de acoplamento (Fig. 12B). Isto, xunto coas alteracións no patrón de localización da Cx43 que se apreciou nos ensaios inmunohistoquímicos nas mostras de pel sometida a quimioterapia (Fig. 10B), podería asociarse coa cicatrización deficitaria presente en pacientes suxeitas a este tratamento, xa que a comunicación celular necesaria para unha correcta reparación cutánea atoparíase comprometida, afectando por tanto á proliferación, migración e diferenciación celular.

Para o desenvolvemento de estudos futuros sobre a implicación da Cx43 no cancro mamario e nos procesos de rexeneración, reparación e cicatrización cutánea asociados a tratamentos de quimio e radioterapia, será necesario incorporar un maior número mostral, analizar en detalle posibles modificacións postraducionais, investigar as funcións da proteína e incluír mostras de diferentes estadios do avance tumoral, para así poder

describir o papel das conexas no inicio, progreso e metástase, aspectos actualmente suxeitos a gran controversia e debate.

## 7.\_ CONCLUSIÓNS

### Obxectivo 1

- Os diferentes subtipos de cancro mamario amosaron perda da Cx43 nas células tumorais das zonas infiltrantes a excepción do luminal B.
- No caso de tumores *in situ*, as células tumorais presentaron niveis baixos da proteína e localizada no citoplasma celular.
- As células tumorais do subtipo de cancro mamario luminal B con lesións infiltrantes sobreexpresaron Cx43 a nivel de membrana e citoplasma.
- As rexións tumorais infiltrantes sometidas a quimioterapia amosaron redución da Cx43 en comparación coas mostras prequimioterapia (subtipo triplo negativo).
- As células presentes en mamas sas adxacentes inmediata e non inmediata á rexión tumoral mostraron positividade para a Cx43 nas membranas das células mioepiteliais en niveis moderados, semellantes ao control de mama sa, a excepción do subtipo HER2+, que amosou niveis elevados da proteína nas zonas sas.

### Obxectivo 2

- Os fibroblastos dérmicos de pel sometida a radioterapia presentaron sobreexpresión da Cx43 con modificacións postraducionais, un potencial fenotipo senescente, e niveis moi baixos de acoplamento celular mediante unións comunicantes.
- A pel sometida a quimioterapia amosou alteracións na localización da expresión da Cx43 na epiderme, e os fibroblastos dérmicos mostraron unha comunicación celular deficitaria.

## **8.\_ AGRADECIMENTOS**

Aos meus directores, María D. Mayán e Benigno Acea, pola supervisión e orientación na execución do traballo; a Paz Santiago pola interpretación dos cortes histolóxicos; a María Vázquez, pola súa axuda na obtención das mostras; a Carlota Díaz, pola súa axuda, implicación no traballo e información clínica; a Lula, pola colaboración no desenvolvemento deste traballo; a Marta Varela e Paula Carpintero pola súa disponibilidad, supervisión e axuda; aos demais membros do grupo CellCOM do INIBIC pola súa axuda; e a Luis Barrio pola colaboración e execución de experimentos que nos permitiron confirmar os resultados obtidos.

## **9.\_ BIBLIOGRAFÍA**

1. Morris EA. The normal breast. En: Morris EA, Liberman L, editores. Breast MRI. Diagnosis and Intervention. 1ª ed. New York, NY, EEUU: Springer-Verlag; 2005, p. 23-44.
2. Wellings SR, Jensen HM, Marcum RG. An atlas of subgross pathology of the human breast with special reference to possible precancerous lesions. J Natl Cancer Inst. 1975; 55(2): 231-73.
3. Bogaert LJ. Mammary hyperplastic and preneoplastic changes: taxonomy and grading. Breast Cancer Res Treat. 1984; 4(4): 315-22.
4. Harris JR, Lippman ME, Morrow M, Hellman S. Diseases of the Breast. 1ª ed. Philadelphia, PA, EEUU: Lippincott-Raven Publishers; 1996.
5. Boecker W, Weigel S, Heindel W, Stute P. The normal breast. En: Boecker W, editor. Preneoplasia of the Breast. A new conceptual approach to proliferative breast disease. 1ª ed. Munich, Alemania: Elsevier Saunders; 2006, p. 1-27.
6. Russo J, Russo IH. Histological evaluation of the normal breast. En: Russo J, Russo IH, editores. Techniques and methodological approaches

in breast cancer research. 1<sup>a</sup> ed. New York, NY, EEUU: Springer; 2014, p. 45-74.

**7.** Sternlicht MD, Kedeshian P, Shao ZM, Safarians S, Barsky SH. The human myoepithelial cell is a natural tumor suppressor. *Clin Cancer Res.* 1997; 3(11): 1949-58.

**8.** Deugnier MA, Teulière J, Faraldo MM, Thiery JP, Glukhova MA. The importance of being a myoepithelial cell. *Breast Cancer Res.* 2002; 4(6): 224-30.

**9.** Gudjonsson T, Ronnov-Jessen L, Villadsen R, Rank F, Bissell MJ, Petersen OW. Normal and tumorderived myoepithelial cells differ in their ability to interact with luminal breast epithelial cells for polarity and basement membrane deposition. *J Cell Sci.* 2002; 115(Pt 1): 39-50.

**10.** Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer.* 2015; 136(5): E359-86.

**11.** Bray F, Ren JS, Masuyer E, Ferlay J. Estimates of global cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008. *Int J Cancer.* 2013; 132(5): 1133-45.

**12.** Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM). Las cifras del cáncer en España 2016. Madrid: SEOM, 2016.

**13.** American Cancer Society. Breast Cancer Facts and Figures 2015-2016. Atlanta, GA, EEUU: American Cancer Society, Inc. 2015.

**14.** Barnard ME, Boeke CE, Tamimi RM. Established breast cancer risk factors and risk on intrinsic tumor subtypes. *Biochim Biophys Acta.* 2015; 1856(1): 73-85.

- 15.** Dieci MV, Orvieto E, Dominici M, Conte PF, Guarneri V. Rare breast cancer subtypes: histological, molecular, and clinical peculiarities. *Oncologist*. 2014; 19(8): 805-13.
- 16.** Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, Gelber RD, Thürlimann B, Senn HJ. Strategies for subtypes – dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Ann Oncol*. 2011; 22(8): 1736-47.
- 17.** Anderson WF, Rosenberg PS, Prat A, Perou CM, Sherman ME. How many etiological subtypes of breast cancer: two, three, four, or more? *J Natl Cancer Inst*. 2014; 106(8): dju165.
- 18.** Parise CA, Caggiano V. Breast cancer survival defined by the ER/PR/HER2 subtypes and a surrogate classification according to tumor grade and immunohistochemical biomarkers. *J Cancer Epidemiol*. 2014; 2014: 469251.
- 19.** Blows FM, Driver KE, Schmidt MK, Broeks A, Leeuwen FE, Wesseling J et al. Subtyping of breast cancer by immunohistochemistry to investigate a relationship between subtype and short and long term survival: a collaborative analysis of data for 10,159 cases from 12 studies. *PLoS Med*. 2010; 7(5): e1000279.
- 20.** Perou CM, Børresen-Dale AL. Systems biology and genomics of breast cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2011; 3(2): a003293.
- 21.** Kumar NM, Gilula NB. The gap junction communication channel. *Cell*. 1996; 84(3): 381-8.
- 22.** Alexander DB, Goldberg GS. Transfer of biologically important molecules between cells through gap junction channels. *Curr Med Chem*. 2003; 10(19): 2045-58.
- 23.** Bennett MV, Verselis VK. Biophysics of gap junctions. *Semin Cell Biol*. 1992; 3(1): 29-47.

24. Laird DW. Life cycle of connexins in health and disease. *Biochem J.* 2006; 394(3): 527-43.
25. Söhl G, Willecke K. Gap junctions and the connexin protein family. *Cardiovasc Res.* 2004; 62(2): 228-32.
26. Goodenough DA, Goliger JA, Paul DL. Connexins, connexons, and intercellular communication. *Annu Rev Biochem.* 1996; 65: 475-502.
27. Saez JC, Berthoud VM, Branes MC, Martinez AD, Beyer EC. Plasma membrane channels formed by connexins: their regulation and functions. *Physiol Rev.* 2003; 83(4): 1359-400.
28. Söhl G, Willecke K. An update on connexin genes and their nomenclature in mouse and man. *Cell Commun Adhes.* 2003; 10(4-6): 173-80.
29. Wiszniewski L, Limat A, Saurat JH, Meda P, Salomon D. Differential expression of connexins during stratification of human keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 2000; 115(2): 278-85.
30. Di WL, Gu Y, Common JE, Aasen T, O'Toole EA, Kelsell DP et al. Connexin interaction patterns in keratinocytes revealed morphologically and by FRET analysis. *J Cell Sci.* 2005; 118(Pt 7): 1505-14.
31. Gros DB, Jongsma HJ. Connexins in mammalian heart function. *BioEssays.* 1996; 18(9): 719-30.
32. Paul DL. Molecular cloning of cDNA for rat liver gap junction protein. *J Cell Biol.* 1986; 103(1): 123-34.
33. Zhang JT, Nicholson BJ. The topological structure of connexin 26 and its distribution compared to connexin 32 in hepatic gap junctions. *J Membr Biol.* 1994; 139(1): 15-29.

- 34.** Liu XZ, Walsh J, Mburu P, Kendrick-Jones J, Cope MJ, Steel KP et al. Mutations in the myosin VIIA gene cause non-syndromic recessive deafness. *Nat Genet.* 1997; 16(2): 188-90.
- 35.** Paznelas WA, Boyadjiev SA, Shapiro RE, Daniels O, Wollnik B, Keegan CE et al. Connexin 43 (GJA1) mutations cause the pleiotropic phenotype of oculodentodigital dysplasia. *Am J Hum Genet.* 2003; 72(2): 408-18.
- 36.** Laird D. The gap junction proteome and its relationship to disease. *Trends Cell Biol.* 2010; 20(2): 92-101.
- 37.** Stewart MK, Simek J, Laird DW. Insights into the role of connexins in mammary gland morphogenesis and function. *Reproduction.* 2015; 149(6): R279-90.
- 38.** Wilgenbus KK, Kirkpatrick CJ, Knuechel R, Willecke K, Traub O. Expression of Cx26, Cx32 and Cx43 gap junction proteins in normal and neoplastic human tissues. *Int J Cancer.* 1992; 51(4): 522-9.
- 39.** Pozzi A, Risek B, Kiang DT, Gilula NB, Kumar NM. Analysis of multiple gap junction gene products in the rodent and human mammary gland. *Exp Cell Res.* 1995; 220(1): 212-9.
- 40.** Monaghan P, Clarke C, Perusinghe NP, Moss DW, Chen XY, Evans WH. Gap junction distribution and connexin expression in human breast. *Exp Cell Res.* 1996; 223(1): 29-38.
- 41.** Jamieson S, Going JJ, D'Arcy R, George WD. Expression of gap junction proteins connexin 26 and connexin 43 in normal human breast and in breast tumours. *J Pathol.* 1998; 184(1): 37-43.
- 42.** Laird DW, Fistouris P, Batist G, Alpert L, Huynh HT, Carystinos GD et al. Deficiency of connexin43 gap junctions is an independent marker for breast tumors. *Cancer Res.* 1999; 59(16): 4104-10.



- 43.** Teleki I, Szasz AM, Maros ME, Gyorffy B, Kulka J, Meggyeshazi N et al. Correlations of differentially expressed gap junction connexins Cx26, Cx30, Cx32, Cx43 and Cx46 with breast cancer progression and prognosis. *PLoS One*. 2014; 9(11): e112541.
- 44.** Plante I, Laird DW. Decreased levels of connexin43 result in impaired development of the mammary gland in a mouse model of oculodentodigital dysplasia. *Dev Biol*. 2008; 318(2): 312-22.
- 45.** Plum A, Hallas G, Magin T, Dombrowski F, Hagendorff A, Schumacher B et al. Unique and shared functions of different connexins in mice. *Curr Biol*. 2000; 10(18): 1083-91.
- 46.** McLachlan E, Shao Q, Laird DW. Connexins and gap junctions in mammary gland development and breast cancer progression. *J Membr Biol*. 2007; 218(1-3): 107-21.
- 47.** McLachlan E, Shao Q, Wang HL, Langlois S, Laird DW. Connexins act as tumor suppressors in three-dimensional mammary cell organoids by regulating differentiation and angiogenesis. *Cancer Res*. 2006; 66(20): 9886-94.
- 48.** Kanczuga-Koda L, Sulkowski S, Lenczewski A, Koda M, Wincewicz A, Baltaziak M et al. Increased expression of connexins 26 and 43 in lymph node metastases of breast cancer. *J Clin Pathol*. 2006; 59(4): 429-33.
- 49.** Czyz J. The stage-specific function of gap junctions during tumorigenesis. *Cell Mol Biol Lett*. 2008; 13(1): 92-102.
- 50.** El-Saghir JA, El-Habre ET, El-Sabban ME, Talhouk RS. Connexins: a junctional crossroad to breast cancer. *Int J Dev Biol*. 2011; 55(7-9): 773-80.
- 51.** Jiang JX, Penuela S. Connexin and pannexin channels in cancer. *BMC Cell Biol*. 2016; 17 (Suppl 1): 12.

- 52.** Otto S. *Oncology Nursing*. 4<sup>a</sup> ed. Philadelphia, PA, EEUU: Mosby; 2001.
- 53.** Hassey Dow K, Dunn Bulcholz J, Iwamoto R et al. *Nursing Care in Radiation Oncology*. 2<sup>a</sup> ed. Pennsylvania, PA, EEUU: WB Saunders; 1997.
- 54.** Dormand E, Banwell PE, Goodcare TE. Radiotherapy and wound healing. *Int Wound J*. 2005; 2(2): 1-20.
- 55.** Payne WG, Naidu DK, Wheeler CK, Barkoe D, Mentis M, Salas RE et al. Wound healing in patients with cancer. *Eplasty*. 2008; 8: e9.
- 56.** Ferguson MK. The effect of antineoplastic agents on wound healing. *Surg Gynecol Obstet*. 1982; 154(3): 421-9.
- 57.** Karppinen V, Myllarniemi H. Vascular reactions in the healing laparotomy wound under cytostatic treatment. *Acta Chir Scand*. 1970; 136(8): 675-80.
- 58.** Myllarniemi H, Peltokallio P. The effect of high dose cyclophosphamide therapy in the abdominal cavity of the rat: adhesions and their vascular pattern. *Ann Chir Gynaecol Fenn*. 1974; 63(3): 238-45.
- 59.** Hendriks T, Martens MF, Huyben CM, Wobbes T. Inhibition of basal and TGF beta-induced fibroblast collagen synthesis by antineoplastic agents. Implications for wound healing. *Br J Cancer*. 1993; 67(3): 545-50.
- 60.** Scott CA, Tattersall D, O'Toole EA, Kelsell DP. Connexins in epidermal homeostasis and skin disease. *Biochim Biophys Acta*. 2012; 1818(8): 1952-61.
- 61.** Churko JM, Laird DW. Gap junction remodeling in skin repair following wounding and disease. *Physiology (Bethesda)*. 2013; 28(3): 190-8.

- 62.** Ehrlich HP. A snapshot of direct cell-cell communications in wound healing and scarring. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2013; 2(4): 113-21.
- 63.** Ongstad EL, O'Quinn MP, Ghatnekar GS, Yost MJ, Gourdie RG. A connexin 43 mimetic peptide promotes regenerative healing and improves mechanical properties in skin and heart. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2013; 2(2): 55-62.
- 64.** Ko K, Arora P, Lee W, McCulloch C. Biochemical and functional characterization of intercellular adhesion and gap junctions in fibroblasts. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2000; 279(1): 147-57.
- 65.** Coutinho P, Qiu C, Frank S, Tamber K, Becker D. Dynamic changes in connexin expression correlate with key events in the wound healing process. *Cell Biol Int*. 2003; 27(7): 525-41.
- 66.** Kretz M, Euwens C, Hombach S, Eckardt D, Teubner B, Traub O et al. Altered connexin expression and wound healing in the epidermis of connexin-deficient mice. *J Cell Sci*. 2003; 116(Pt 16): 3443-52.
- 67.** Meşe G, Richard G, White TW. Gap junctions: basic structure and function. *J Invest Dermatol*. 2007; 127(11): 2516-24.
- 68.** Caputo R, Peluchetti D. The junctions of normal human epidermis. A freeze-fracture study. *J Ultrastruct Res*. 1977; 61(1): 44-61.
- 69.** Risek B, Klier FG, Gilula NB. Multiple gap junction genes are utilized during rat skin and hair development. *Development*. 1992; 116(3): 639-51.
- 70.** Salomon D, Masgrau E, Vischer S, Ullrich S, Dupont E, Sappino P et al. Topography of mammalian connexins in human skin. *J Invest Dermatol*. 1994; 103(2): 240-7.

- 71.** Martin PEM, George CH, Castro C, Kendall JM, Capel J, Campbell AK et al. Assembly of chimeric connexin-aequorin proteins into functional gap junction channels. *J Biol Chem.* 1998; 273(3): 1719-26.
- 72.** Li L, Yan Y, Xu H, Qu T, Wang B. Selection of reference genes for gene expression studies in ultraviolet B-irradiated human skin fibroblasts using quantitative real-time PCR. *BMC Mol Biol.* 2011; 12: 8.
- 73.** Kańczuga-Koda L, Sulkowska M, Koda M, Reszeć J, Famulski W, Baltaziak M et al. Expression of connexin 43 in breast cancer in comparison with mammary dysplasia and the normal mammary gland. *Folia Morphol (Warsz).* 2003; 62(4): 439-42.
- 74.** Naus C, Laird D. Implications and challenges of connexin connections to cancer. *Nat Rev Cancer.* 2010; 10(6): 435-41.
- 75.** Bates DC, Sin WC, Aftab Q, Naus CC. Connexin43 enhances glioma invasion by a mechanism involving the carboxy terminus. *Glia.* 2007; 55(15): 1554-64.
- 76.** Monaghan P, Perusinghe NP, Cowen P, Gusterson BA. Peripubertal human breast development. *Anat Rec.* 1990; 226(4): 501-8.
- 77.** Chen F, Zhuang X, Lin L, Yu P, Wang Y, Shi Y et al. New horizons in tumor microenvironment biology: challenges and opportunities. *BMC Med.* 2015; 13: 45.
- 78.** Azzam EI, de Toledo SM, Little JB. Expression of CONNEXIN43 is highly sensitive to ionizing radiation and other environmental stresses. *Cancer Res.* 2003; 63(21): 7128-35.
- 79.** Glover D, Little JB, Lavin MF, Gueven N. Low dose ionizing radiation-induced activation of connexin 43 expression. *Int J Radiat Biol.* 2003; 79(12): 955-64.

**80.** Ghosh S, Kumar A, Tripathi RP, Chandna S. Connexin-43 regulates p38-mediated cell migration and invasion induced selectively in tumour cells by low doses of  $\gamma$ -radiation in an ERK-1/2-independent manner. Carcinogenesis. 2014; 35(2): 383-95.

**81.** Sabin RJ, Anderson RM. Cellular Senescence - its role in cancer and the response to ionizing radiation. Genome Integr. 2011; 2(1): 7.

## **ANEXOS**

### **ANEXO 1: MODELO DOCUMENTO DE INFORMACIÓN PARA PARTICIPANTES NO PROXECTO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA**

TÍTULO: COLECCIÓN DE MUESTRAS PARA EL DESARROLLO DE LA LÍNEA DE INVESTIGACIÓN TRASLACIONAL EN COMUNICACIÓN Y SEÑALIZACIÓN CELULAR.

IDENTIDAD RESPONSABLE: .....

GRUPO DE INVESTIGACIÓN: GRUPO DE INVESTIGACIÓN TRASLACIONAL EN COMUNICACIÓN Y SEÑALIZACIÓN CELULAR.

INVESTIGADOR CLÍNICO COLABORADOR: .....

SERVICIO MÉDICO: UNIDAD DE MAMA. SERVICIO DE CIRUGÍA GENERAL.

CENTRO: XERENCIA XESTIÓN INTEGRADA A CORUÑA (XXIAC) – INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA A CORUÑA (INIBIC).

FINALIDAD DE LA PARTICIPACIÓN.-

Le invitamos a colaborar en la creación de una colección de muestras para su uso en la Línea de investigación traslacional en comunicación y señalización celular.

Las muestras obtenidas para el diagnóstico o control de las enfermedades, una vez empleadas con esta finalidad, resultan también útiles y necesarias para otras investigaciones. De hecho, muchos de los

avances científicos obtenidos en los últimos años en medicina son fruto de este tipo de estudios.

Toda investigación biomédica requiere recoger datos y muestras biológicas de personas afectadas por la patología a estudiar y de personas no afectadas por dicha enfermedad, para analizarlas y obtener conclusiones para conocer mejor y avanzar en el diagnóstico y/o tratamiento de las enfermedades que se van a investigar.

El objetivo principal de la Línea de investigación traslacional en comunicación y señalización celular es estudiar la función de unas proteínas que se encuentran en el organismo humano y se denominan conexinas y panexinas para conocer mejor su funcionamiento en tejidos como la piel y su implicación en el desarrollo de enfermedades tales como melanoma, cáncer basocelular, cáncer de mama, psoriasis, etc. Con nuestras investigaciones intentaremos mejorar el conocimiento, diagnóstico, pronóstico y tratamiento de los pacientes afectados por alguna de las enfermedades antes indicadas.

Las muestras ubicadas en esta colección se utilizarán en los distintos proyectos de investigación en los que participen los responsables de la misma, ..... y cualquier otro personal adscrito o colaborador de los Grupos de Investigación participantes; siempre y cuando, dichos estudios se enmarquen en la finalidad de esta línea de investigación.

Debe saber que la realización de todos estos proyectos de investigación en los que se utilicen estas muestras, será previamente autorizada por el Comité de Ética competente.

Toda la información que le facilitamos en este documento y la actividad del Grupo de investigación y el Biobanco están reguladas por la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de Diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal (LOPD), la Ley 14/2007, de 3 de Julio de Investigación Biomédica (LIBM), el Real Decreto 1716/2011, de 11 de noviembre.

Su participación es totalmente voluntaria. Si firma el consentimiento informado, confirmará que desea participar. Puede negarse a participar o retirar su consentimiento en cualquier momento posterior a la firma sin

tener que explicar los motivos. Su no-participación o retirada posterior del consentimiento no afectará en modo alguno a su atención sanitaria presente o futura.

Antes de firmar el consentimiento puede preguntarnos cualquier duda que le surja o consultar con terceras personas.

#### MUESTRAS BIOLÓGICAS E INFORMACIÓN ASOCIADA. RIESGOS.-

MUESTRAS BIOLÓGICAS (Sangre, Líquidos Biológicos, Tejidos) que se han obtenido durante su atención sanitaria en este centro hospitalario y que ya no es necesario utilizarlas para la finalidad por la que se obtuvieron.

El responsable guardará y dispondrá de estas muestras sobrantes para realizar los estudios de investigación biomédica. Las muestras y la información asociada a las mismas se almacenarán en las áreas establecidas para tal fin, dentro de las instalaciones del Complejo Hospitalario Universitario A Coruña (CHUAC) – Xerencia Xestión Integrada A Coruña (XXIAC) bajo la responsabilidad de .....

Es muy importante subrayar que, para la obtención de las muestras, no se le someterá a ninguna prueba ni riesgo adicional a los que deriven de su adecuada atención médica.

La donación de estas muestras no impedirá que usted o su familia puedan usarlas, cuando sea necesario por motivos de salud, siempre que estén disponibles y no hayan sido anonimizadas.

INFORMACIÓN CLÍNICA que, junto con los resultados de los estudios realizados en las muestras, nos permita extraer conclusiones útiles para el manejo de las enfermedades. Para el buen desarrollo de los estudios de investigación, es necesario obtener datos clínicos relativos al donante de las muestras, por lo que necesitaremos acceder a su historia clínica para recabar la información que será conservada junto a la muestra. (Más información en el apartado de Confidencialidad.)

En caso de ser necesaria alguna información o muestra adicional, y siempre que usted nos lo autorice en la hoja de consentimiento, la institución sanitaria se podría poner en contacto con usted para solicitarle nuevamente su colaboración.

#### CONDICIONES DE LA DONACIÓN.-

La donación y utilización de muestras biológicas humanas será gratuita, por lo que usted no obtendrá ni ahora ni en el futuro ningún beneficio económico por la misma. Usted renuncia a cualquier derecho de naturaleza económica, patrimonial o potestativa sobre los resultados o potenciales beneficios económicos que puedan derivarse de las investigaciones que se realicen con la muestra que cede.

Tampoco obtendrá ningún otro beneficio directo para su salud como resultado de su donación. Sin embargo, los conocimientos obtenidos gracias a los estudios llevados a cabo a partir de su muestra y de muchas otras pueden ayudar al avance médico y, por ello, a otras personas.

La titularidad de los resultados de la investigación corresponderá al investigador y a la Institución donde se realice la investigación. Las muestras podrán ser cedidas a grupos de investigación bajo acuerdos de colaboración y siempre para investigación biomédica supervisada por Comités Científicos y de Ética acreditados.

#### CONFIDENCIALIDAD.-

Toda la información referida a usted será considerada confidencial y tratada en base a las indicaciones establecidas en la normativa indicada al inicio de este documento. Tal información sólo estará disponible para el personal autorizado, el cual tiene el deber legal de guardar secreto. Sus muestras y sus datos clínicos asociados a las mismas, pasarán a formar parte del fichero de datos del Centro.

Para garantizar la confidencialidad de su identidad (asegurar que la información de su muestra no se relaciona con su identidad), su muestra sólo irá identificada, desde su entrada en la investigación, con un código. Sólo este código, y nunca su identidad aparecerá en el material con el



que se trabaje. La relación entre su código y su identidad, quedará custodiada por el personal autorizado, en una base de datos que cumple todos los requisitos legales exigidos. De esta manera podemos asegurar que cualquier información que se obtenga a partir de sus muestras, permanezca confidencial pero pueda ser asociada a sus datos, por si fuera información de interés clínico.

La cesión de las muestras y los datos asociados a las mismas, a los investigadores colaboradores con este grupo de investigación, comunitarios (países miembros de la Unión Europea) o extracomunitarios (no miembros), se efectuará con carácter general de manera anónima o disociada, es decir, sólo se cederá la muestra asociada a datos genéricos, sin que se pueda identificar por medios razonables su identidad. En las investigaciones en las que se considere necesario para el desarrollo de las mismas, a propuesta del investigador responsable y previa autorización del comité de ética competente, podrán enviarse sus muestras codificadas (se mantendrá por el investigador responsable el vínculo que relaciona su identidad con la muestra cedida). A todos ellos se les exigirá que nos garanticen que trabajarán con el mismo nivel de protección de datos exigido por la normativa española.

Todo proyecto en el que se usen muestras deberá estar previamente autorizado por el Comité de Ética competente.

Por otro lado, es posible que los resultados de las investigaciones sean publicados en la literatura científica, pero entendiendo estos resultados como los obtenidos de la totalidad de las muestras, no los resultados individuales. Si este fuera el caso, su identidad permanecerá completamente confidencial y nunca formará parte de ninguna publicación.

Con su aceptación a participar con la Colección de muestras para el desarrollo de la línea de investigación traslacional en comunicación y señalización celular, usted accede a que esta información pueda ser transferida en las mencionadas condiciones. Usted puede no autorizarnos

a realizar las cesiones aquí indicadas, indicando su decisión en el apartado correspondiente de la hoja del consentimiento informado.

Puede ejercitar los DERECHOS ACCESO, RECTIFICACIÓN, CANCELACIÓN Y/O OPOSICIÓN (DERECHOS ARCO) que le reconoce la normativa española, dirigiendo su solicitud por escrito junto a una copia de su DNI (con el fin de garantizar que el ejercicio de estos derechos es realizado por la persona autorizada para ello) a:

- ENTREGA EN PERSONA, en la Secretaría Unidad de Mama del Servicio de Cirugía General, del Hospital Abente y Lago, a la atención de .....
- CORREO POSTAL: .....
- CORREO ELECTRÓNICO: .....

Usted puede contactar con los responsables de la Línea de investigación traslacional en comunicación y señalización celular, ....., si le surge cualquier duda sobre su participación en esta investigación, en el Teléfono: ..... En todo momento se pondrán los medios necesarios para facilitarle la información más adecuada.

Si usted decide REVOCAR SU CONSENTIMIENTO, deberá hacernos llegar, de cualquiera de las maneras descritas anteriormente, a la atención de alguno de los responsables de esta Línea de Investigación ....., la hoja de revocación totalmente cubierta y firmada que aparece al final de este documento.

Usted debe saber que la revocación tendrá efectos a partir del momento en que se formalice y no afectará a los datos resultantes de las investigaciones que ya se hayan llevado a cabo hasta ese momento.

#### RESTRICCIONES DE USO DE LA MUESTRA.-

Usted puede indicarnos si quiere establecer algún tipo de restricción sobre sus muestras y datos, en relación a su posible uso en determinados proyectos de investigación o en cuanto a determinadas cesiones. Para

ello dispone de un apartado específico en la hoja de firma del consentimiento informado.

#### INFORMACIÓN SOBRE RESULTADOS DE LA INVESTIGACIÓN.-

La evaluación de los resultados se hará sólo por grupos (por ejemplo, hombres / mujeres, grupos de edad, diagnósticos, etc.) y no de forma individual. Debe comprender que los resultados de valor que se pudieran obtener provendrían del estudio de múltiples muestras, y en ningún caso de la suya exclusivamente.

Las implicaciones médicas de los resultados de las distintas pruebas, si es que los hay, sólo serán conocidas cuando se haya completado la investigación.

El responsable de la investigación tendrá a disposición de los participantes la información sobre los proyectos de investigación en los que se utilicen las muestras y datos.

En determinadas circunstancias el Comité de Ética competente podrá decidir si es necesario contactar con el participante para facilitarle información de manera individualizada.

Las diferentes investigaciones en las que se utilicen sus muestras y datos pueden requerir la realización de estudios de biología celular y genéticos, y a partir de ellos se puede obtener información que puede ser relevante para su salud o la de su familia. En los estudios genéticos se puede descubrir información no buscada, lo que se denominan hallazgos inesperados. Cuando esto se produzca, los resultados obtenidos serán validados y analizados por profesionales para determinar si son fiables en un porcentaje óptimo que aconseje su comunicación a las personas afectadas.

Usted debe saber que tiene derecho a conocer, o no, la información obtenida con el análisis de sus muestras.

En el caso de que usted decida no ser informado, la ley establece que cuando la información obtenida sea necesaria para evitar un grave perjuicio para la salud de sus familiares, un Comité de expertos estudiará

el caso y deberá decidir entre la conveniencia o no de informar a los afectados o a sus representantes legales.

#### DESTINO FINAL DE LA MUESTRA

Cuando así lo determine la persona responsable de la Línea de investigación con la que usted accedió a colaborar con sus muestras y datos, y siempre que así lo autorice en la hoja de firma del consentimiento informado, las muestras sobrantes junto a los datos asociados serán depositadas en el Biobanco A Coruña de la Xerencia Xestión Integrada A Coruña.

Los Biobancos son bancos de almacenamiento de muestras de origen humano para su utilización en investigaciones nacionales o internacionales dentro del campo de la biomedicina. Su funcionamiento se centra en gestionar, bajo criterios de seguridad, calidad y eficiencia; la recepción, procesamiento, almacenamiento y posterior cesión de muestras a los investigadores solicitantes, para que utilicen las mismas en sus proyectos de investigación; siempre y cuando, éstos cumplan todos los requisitos éticos y legales exigibles para este tipo de prácticas.

El Biobanco guardará y dispondrá de estas muestras sobrantes para realizar los estudios de investigación biomédica. Las muestras y la información asociada a las mismas se almacenarán en las áreas establecidas para tal fin, dentro de las instalaciones de la Xerencia Xestión Integrada A Coruña, bajo la responsabilidad de la Dirección del Biobanco A Coruña

El biobanco podrá repercutir únicamente los costes de obtención, procesado y envío de las muestras a los investigadores/instituciones que las solicitaron.

El Biobanco A Coruña asume como propio todo lo descrito en los apartados previos de este documento en relación a la confidencialidad, los posibles hallazgos, etc.

TITULAR DIRECCIÓN CIENTÍFICA: .....

TELÉFONO CONTACTO: .....

**CIERRE DEL BIOBANCO.-**

De producirse un eventual cierre del biobanco o revocación de la autorización para su constitución y funcionamiento, la información sobre el destino de las muestras estará a su disposición en la página web del Biobanco y/o Centro Hospitalario [www.hospitalcoruna.es](http://www.hospitalcoruna.es) - [www.inibic.es](http://www.inibic.es) y en el Registro Nacional de Biobancos para Investigación Biomédica del Instituto de Salud Carlos III (ISC III), con página web [www.isciii.es](http://www.isciii.es), con el fin de que pueda manifestar su conformidad o disconformidad con el destino previsto para las muestras.

Muchas gracias por su colaboración.

**ANEXO 2: MODELO CONSENTIMIENTO INFORMADO DO PARTICIPANTE MAIOR DE IDADE, TESTEMUÑA E REPRESENTANTE LEGAL**

(Espacio para colocar la etiqueta con los datos del donante muestra)

Yo,.....

..... (Nombre y apellidos del participante manuscritos) he leído la hoja de información y pude hacer todas las preguntas que consideré necesarias, y acepto participar en la Colección de muestras para el desarrollo de la Línea de Investigación Traslacional en Comunicación y Señalización Celular con mis muestras y datos para que se utilicen en las condiciones que me han informado.

**RESTRICCIONES DE USO** (usted podrá indicarnos cruzando la correspondiente casilla las restricciones de uso que considere. En caso de no marcar ninguna casilla entenderemos que NO manifiesta ninguna condición de uso).

- NO autorizo a utilizar mis muestras y datos en investigaciones que  
.....  
.....  
.....
- NO autorizo a que consulten y obtengan información de mi historia clínica.
- NO acepto que contacten conmigo cuando sea necesario.
- NO quiero ser informado de los resultados de las investigaciones que sean de interés para mi salud.
- NO autorizo la cesión de mis muestras y datos de manera codificada (disociada).
- NO autorizo la cesión de mis muestras y datos fuera de la Unión Europea.
- NO autorizo el depósito en el Biobanco A Coruña - XXIAC de mis muestras y datos en las condiciones indicadas en la hoja de información.

Si acepta que se contacte con usted cuando sea necesario, por favor indique su Teléfono / E-mail de contacto:

.....

Firma del participante

Firma de la persona que informa

Identidad del participante: .....

Identidad de la persona que informa: .....

Firma del testigo

Confirma el consentimiento verbal del participante, el cual lo autoriza a firmar en su nombre

Identidad del testigo:

.....

..... DNI: .....

Solo se firmará en aquellos casos en los que el participante no pueda leer y/o escribir y delegue la firma en el testigo.

Firma del representante legal

Identidad representante legal:

.....

DNI: .....

Solo se firmará en aquellos casos en los que el participante esté incapacitado legalmente.

En ....., a ..... de ..... de .....

Le agradecemos su desinteresada colaboración con el avance de la ciencia y la medicina.